

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES MYCOBACTÉRIES ATYPIQUES

CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES DE TROIS SOUCHES
DE MYCOBACTERIUM AQUAE (Galli Valerio 1912)
ISOLÉES DANS LA THÉLITE NODULAIRE TUBERCULOIDE
DE LA VACHE LAITIÈRE

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 18 Mars 1964

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

PAR

Félicien CAILLÈRE

Né le 18 Juillet 1939, à LYON (Rhône)



LYON

Imprimerie BOSC Frères
42, quai Gailleton, 42

1964

CONTRIBUTION A L'ETUDE
DES MYCOBACTERIES ATYPIQUES
CARACTERES BACTERIOLOGIQUES DE TROIS SOUCHES
DE MYCOBACTERIUM AQUÆ (Galli Valerio, 1912)
ISOLEES DANS LA THELITE NODULAIRE TUBERCULOIDE
DE LA VACHE LAITIERE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES MYCOBACTÉRIES ATYPIQUES

CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES DE TROIS SOUCHES
DE MYCOBACTERIUM AQUAE (Galli Valerio 1912)
ISOLÉES DANS LA THÉLITE NODULAIRE TUBERCULOIDE
DE LA VACHE LAITIÈRE

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 18 Mars 1964

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR VÉTÉRAIRE

PAR

Félicien CAILLÈRE

Né le 13 Juillet 1939, à LYON (Rhône)



LYON

Imprimerie BOSC Frères
42, quai Gailleton, 42

1964

PERSONNEL ENSEIGNANT DE L'ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Directeur	M. FLORIO
Directeur honoraire	M. JUNG
Directeur honoraire	M. TAPERNOUX
Professeur honoraire	M. CUNY

PROFESSEURS

14 chaires

Pharmacie et Toxicologie	MM. TAPERNOUX
Anatomie descriptive, Extérieur, Anatomie appliquée	BARONE
Physiologie, Thérapeutique, Pharmacodynamie	BOST
Histologie, Embryologie, Anatomie pathologique	LUCAM
Hygiène et industrie des aliments d'origine animale	FLACHAT
Zoologie appliquée, Parasitologie externe, Parasitologie interne ..	EUZEBY
Pathologie médicale des équidés et des carnivores. Législation vétérinaire	FLORIO
Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour	COTTEREAU
Technique chirurgicale, Pathologie chirurgicale	COLLET
Obstétrique, Pathologie de la Reproduction	BERTRAND
Microbiologie, Immunologie, Maladies contagieuses, Police sani- taire	JOUBERT
Ethnologie, Hygiène, Zootechnie, Economie rurale	FROGET
Botanique appliquée, Agronomie, Alimentation	JEAN-BLAIN
Physique et Chimie biologiques et médicales	MAGAT

CHEFS DE TRAVAUX

MM. FERNEY, RUCKEBUSCH, Agrégés.
MM. BUSSIERAS, LAPRAS, LE NIHOUE, OUDAR, VAN HAVERBEKE,
JEAN-BLAIN Claude

ASSISTANTS

MM. BLAVIGNAC, CHANTEGRELET, PROY, VERINE

EXAMINATEURS DE LA THESE

Président : Monsieur le Professeur MONNET, de la Faculté de Médecine.
Premier Assesseur : Monsieur le Professeur JOUBERT, de l'Ecole Vétérinaire.
Deuxième Assesseur : Monsieur le Professeur FERNET, de l'Ecole Vétérinaire.

La Faculté de Médecine et l'Ecole Vétérinaire déclarent que les opinions émises dans les dissertations qui leur sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elles n'entendent leur donner ni approbation, ni improbation.

A MES PARENTS

Puisse ce travail être un témoignage de ma tendresse filiale et une récompense pour tous les sacrifices qu'ils m'ont consentis.



A TOUTE MA FAMILLE

A Monsieur le Professeur MONNET
de la Faculté de Médecine et Pharmacie de Lyon

Qui nous a fait le grand honneur
d'accepter la présidence de notre jury
de thèse.

Hommage respectueux et reconnaissant.

A Monsieur le Professeur JOUBERT

Professeur de Bactériologie - Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

A qui nous devons le sujet de cette thèse et qui nous fit l'honneur de nous accepter dans son laboratoire.

Modeste témoignage de notre reconnaissance pour l'enseignement que nous avons reçu de lui et pour le bienveillant intérêt qu'il nous a constamment accordé.

A Monsieur le Professeur FERNEY

Agrégé de la Chaire de Pathologie de la Reproduction

Qui a bien voulu faire partie de notre jury de thèse.

Qu'il trouve ici l'expression de notre respectueuse gratitude.

A Monsieur J. OUDAR

Chef de Travaux ataché à la Chaire de Maladies Contagieuses

En témoignage de l'aide qu'il a bien
voulu nous donner.

Sincères remerciements.

A TOUS NOS MAITRES DE L'ECOLE DE LYON

AVANT-PROPOS

Depuis 1960, à la suite d'une enquête épizootiologique systématique auprès des Directeurs Départementaux des Services Vétérinaires de France, le Laboratoire de Bactériologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon étudie les nombreux prélèvements effectués sur des pièces d'exérèse provenant de Vaches laitières atteintes de thélite nodulaire tuberculoïde.

Il fut aisé d'y mettre régulièrement en évidence des bacilles acido-alcool-résistants par bactérioscopie, mais plus difficile de cultiver les souches correspondantes qui présentaient des exigences métaboliques très diverses.

Aidé de notre condisciple Ract (*), nous fûmes incorporés à l'équipe constituée pour l'étude approfondie de cette affection nouvelle — ou nouvellement apparue en France — et qui comprenait les Services de Microbiologie (MM. Joubert, Professeur, et Oudar, Chef de Travaux), de Maladies de la Reproduction (M. Ferney, Agrégé), de l'Ecole Vétérinaire de Lyon, auxquels nous adressons notre vive gratitude.

Nos remerciements vont également à Mlle M. Th. Cordier, Pharmacien, Agent Technique Principal de Recherches, qui nous a considérablement aidés dans notre tâche au Laboratoire de Microbiologie de l'Ecole.

Enfin, précieuse nous fut la collaboration de M. Viallier, Professeur Agrégé à la Faculté de Médecine et à son équipe de l'Institut Pasteur de Lyon, et du Docteur Boisvert de l'Institut Pasteur de Paris.

(*) Thèse de Doctorat Vétérinaire de RACT Maurice, Lyon 1964 (à paraître).

INTRODUCTION ET PLAN

« Les maladies ne sont plus aujourd'hui ce qu'elles étaient hier et ne seront pas demain ce qu'elles sont aujourd'hui. »

« Nous ne devons pas oublier que tout ce que nous prononçons, tout ce que nous écrivons, n'est qu'une traduction maladroite, incomplète, d'un aspect momentané, d'une seconde au cadran illuminé du temps. »

Ch. NICOLLE

(Destin des maladies infectieuses.)

Peu après la découverte du bacille agent de la tuberculose, par Koch, les bactériologues furent contraints d'admettre que la seule vue, dans une préparation traitée par la méthode de Ziehl, d'un bacille coloré en rouge ne suffisait pour affirmer qu'il s'agissait d'un bacille tuberculeux authentique. De nombreux auteurs, comme Rabinowitsch, en 1897, découvrirent des bacilles acido-alcool-résistants dans le beurre, le lait de vaches saines. Il en fut trouvé un peu partout dans la nature : assez fréquemment dans les urines, le smegma, le cérumen (Dienstock en 1886), le fumier (Moeller en 1898), l'eau, et aussi dans les liquides de lavage gastrique, bacilles qui avaient été amenés par les sondes ou l'eau de lavage — Battagliani, Groh, Karson, Feldman, Saenz, Sadettin, Wilson... en rencontrèrent chez les cobayes, lapins, porcs — Hauduroy dans des organes de porcs, moutons, vaches, oiseaux, poissons, cobayes, lièvres, lapins, rats apparemment sains, en a isolé à peu près dans 22 % des cas étudiés (139).

Au laboratoire, on s'est vite rendu compte que ces bacilles se développaient mal à 37°, ou, ne cultivant pas à cette température, qu'ils pouvaient parasiter le cobaye sans le tuer, et ensuite amener une allergie tuberculinique. Il y a quelques

années, le bactériologue, devant ces faits, déclarait que le germe étudié appartenait au groupe des bacilles « paratuberculeux » sans pouvoir pathogène pour l'homme ou pour le cobaye, et que sa présence n'était qu'un banal accident sans signification clinique. Or, tous ces faits, exacts il y a quelques années, ne le sont plus maintenant (141). Ces bacilles banaux ne furent pas particulièrement désignés. Certains doués de pouvoir pathogène pour l'animal ou l'Homme, furent désignés par le nom de l'espèce réceptive (bacilles du campagnol de A.-Q. Wells (1937) : *Mycobacterium microtti*, bacilles des animaux à sang froid), puis, par la suite, rangés dans une classe spéciale. Les Anglo-saxons utilisaient le terme de Mycobactéries « non classées » ou encore de Mycobactéries « anonymes » (Timpe et Runyon) ou de Mycobactéries « saprophytes » pour le seul fait que les souches étudiées ne possédaient aucun pouvoir pathogène pour le cobaye. Cette expression est, à notre avis, la plus mal choisie car, comme l'indique Hauduroy, ces mycobactéries que l'on croit non pathogènes pourront avoir un jour un pouvoir pathogène. L'expression Mycobactéries « atypiques » ne forme pas une véritable entité, mais permet de les opposer aux Mycobactéries classiquement tuberculeuses et d'englober toutes les variétés acido-résistantes pathogènes pour l'Homme et les animaux, à l'exclusion des bactéries tuberculeuses des Mammifères et aviaires.

Le plan de notre travail se divise en deux parties : la première traite de l'étude bactériologique générale des Mycobactéries atypiques, la seconde, de l'étude précise de trois souches atypiques isolées au Laboratoire de Lyon des lésions tuberculoïdes du trayon des vaches laitières.

PREMIERE PARTIE

LES MYCOBACTERIES ATYPIQUES

DEFINITION

Les Mycobactéries atypiques constituent un groupe spécial de bactéries appartenant au genre *Mycobacterium*, lui-même défini par Prévot (237) en ces termes :

« Bâtonnet mince, droit ou légèrement incurvé, parfois filamenteux, rarement ramifié ; pas de conidie ni de spore ; immobile, acilié ; enveloppe cireuse leur conférant l'acido-alcool-résistance ; aérobie avec culture lente sur milieux ordinaires, plus rapide sur milieux spéciaux ; saprophytes ou pathogènes pour l'Homme et les animaux. »

Le groupe des Mycobactéries atypiques peut, au sein du genre *Mycobacterium*, admettre la définition suivante :

Les Mycobactéries atypiques sont des Mycobactéries non essentiellement pathogènes, c'est-à-dire responsables ni des tuberculoses, ni des lèpres humaines et animales. Elles constituent une douzaine d'espèces et de multiples variétés saprophytes, éventuellement pathogènes pour l'Homme et les animaux, et agents de Mycobactérioses atypiques avec lésions pulmonaires, ganglionnaires ou cutanées.

De morphologie et d'affinités tinctoriales semblables entre elles, et par comparaison avec les Mycobactéries essentiellement pathogènes, elles présentent en général des cultures relativement rapides sur les milieux spéciaux, une forte pigmentation rouge ou orange à la lumière (photochromogénèse) ou à l'obscurité (scotochromogénèse) ; une biochimie particulière et une antibiosensibilité polyvalente et très marquée. Leur éventuel pouvoir pathogène expérimental n'est nettement appréciable que chez la Souris, et elles présentent des antigènes, des immunigènes et des allergènes communs entre elles et vis-à-vis des Mycobactéries essentiellement pathogènes.

Commentaires

Pour l'intelligence de cette définition comparative, nécessairement longue, quelques commentaires sont nécessaires.

1° DIFFICULTÉ DE LA DÉFINITION.

La définition de ces Mycobactéries atypiques est particulièrement difficile à donner en raison de leur extrême diversité et de la connaissance, certes précise, mais encore récente que nous en avons. Alors que certains caractères les relient aux Mycobactéries pathogènes (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*), d'autres les en différencient, tout en permettant de les relier entre elles.

2° PRIMAUTÉ DU CARACTÈRE PATHOGÈNE.

Pour les définir, il est donc nécessaire de les replacer dans le cadre du genre *Mycobacterium*, par leur morphologie, leur acido-alcoolo-résistance et certaines de leurs propriétés biologiques. Mais, parallèlement, il est indispensable de leur réserver une place particulière, en se fondant sur leur caractère pathogène spontané négatif : elles ne sont responsables ni des tuberculoses humaines et animales, ni des lèpres humaines et murines. On ne pourra donc les rattacher ni à *M. tuberculosis*, ni à *M. bovis*, ni à *M. avium*, ni à *M. lepræ*, ni à *M. lepræ murium*.

Au contraire, leur caractère commun consiste dans leur saprophytisme, encore que ces germes puissent montrer éventuellement un aspect pathogène spontané ou expérimental. Largement répandues dans l'eau, le sol, les végétaux, les sécrétions ainsi que sur la peau, certaines peuvent occasionnellement devenir pathogènes pour l'Homme, les animaux à sang chaud ou à sang froid : c'est le cas de *M. aquæ*, que nous étudierons en particulier dans ce travail. Les affections provoquées par ces germes revêtent des physionomies différentes, assez spéciales à la Mycobactérie atypique en cause, mais, dans tous les cas, on peut isoler le germe responsable. Aussi les a-t-on réunis sous le nom de « Mycobactérioses atypiques ».

A côté de ces germes occasionnellement pathogènes, d'autres semblent se cantonner toujours dans leur saprophytisme :

par exemple, « *M. phlei* » isolé du foin et des herbes (fléole), ou encore « *M. smegmatis* » plus ubiquitaire encore.

Une certaine homogénéité des caractères bactériologiques ajoutée à ce saprophytisme général des Mycobactéries atypiques, autorise leur réunion dans un groupe bactérien homogène malgré la grande diversité des variétés qui s'y intègrent.

SYNONYMIE

Nous préférons le qualificatif de « atypique » vis-à-vis des Mycobactéries « typiques », c'est-à-dire tuberculeuses, à celui de « anonyme » puisque la plupart des espèces ont reçu un nom ; de « saprophyte » puisque certains sont pathogènes ; de « anormal » car il est difficile de caractériser des Mycobactéries « normales » ; et de « paratuberculeux », qui peut prêter à confusion avec *M. paratuberculosis* (bacille de Johne), agent de l'entérite chronique paratuberculeuse hypertrophiante des Bovidés.

HISTORIQUE

Trois périodes jalonnent l'histoire des Mycobactéries atypiques.

Dans une *première étape*, en même temps qu'étaient découvertes *M. tuberculosis* par Koch, en 1882, *M. avium* par Nocard, en 1885, *M. bovis* par Smith, en 1896, *M. johnei* par Johnne, en 1895, des bacilles acido-alcool-résistants avaient été décelés dans les sécrétions et sur les téguments de l'homme, sans qu'on puisse diagnostiquer de maladie correspondante typée. L'attention ne fut tout d'abord pas attirée par ces germes, puis, devant le nombre croissant d'observations, on les classa dans un groupe de bacilles considérés comme saprophytes : les « para-tuberculeux ».

Dans une *deuxième étape*, il fallut attendre 1920 pour reconnaître le pouvoir pathogène de certains d'entre eux. Déjà Ophüls (220), en 1904, aux Etats-Unis, avait isolé en culture pure une Mycobactérie non tuberculeuse, à partir d'un abcès sous-cutané chez l'homme.

Par la suite, Corbett, en 1918, Schwabacher, en 1933, Boquet, en 1934, Laporte, en 1940, Baldwin, en 1942 et d'autres, isolèrent d'autres germes à partir de lésions diverses.

Dans une *troisième étape*, enfin, à la suite de l'étude de Buhler et Pollak, en 1935, de bacilles trouvés dans des lésions humaines semblables aux lésions tuberculeuses, on s'attacha à mieux connaître ces germes et l'étude des Mycobactéries atypiques prit l'importance qui n'a fait que s'accroître jusqu'à aujourd'hui.

CHAPITRE PREMIER

MORPHOLOGIE ET COLORATION

A) Morphologie

Les Mycobactéries atypiques se présentent sous forme de gros bâtonnets de 3 à 5 μ de long, sur 0,5 μ , en moyenne, rectilignes ou parfois légèrement incurvés, à extrémités arrondies. Ils sont immobiles, aciliés et ne présentent ni spores, ni conidies.

Suivant le milieu et l'âge de la culture, le polymorphisme s'accroît ; on peut ainsi rencontrer des formes coccoïdes, en navettes, renflées en massue ou encore de longs bâtonnets. Cultivés, par exemple, en présence d'acides gras (Tween 80, acide stéarique, lécithine...), on constate une augmentation de leurs dimensions.

B) Coloration

De même que la morphologie, la coloration des Mycobactéries varie avec les milieux. Des germes cultivés sur milieux contenant des acides gras présentent, après coloration de Ziehl, des bandes transversales non colorées par la fuchsine, mais colorables par le Soudan III. Ces altérations n'ont jamais été observées avec *M. tuberculosis*, *bovis* et *avium* (197).

Pour cette étude, il est donc nécessaire d'utiliser des cultures jeunes, effectuées sur les mêmes milieux.

Quatre méthodes de coloration déjà anciennes sont classiquement employées, auxquelles vient s'ajouter maintenant la coloration par fluorescence.

— La méthode de Ziehl classique, basée sur une coloration des bacilles par la fuchsine à chaud, puis un essai de décolo-

ration par l'acide nitrique ou sulfurique, puis par l'alcool, permet de mettre en évidence l'acido-alcool-résistance des Mycobactéries atypiques. La gangue circuse qui enveloppe les bacilles retient la fuchsine qui a pénétré dans le germe grâce au chauffage, et assure leur protection contre l'action conjuguée de l'acide et de l'alcool. Cependant, cette coloration peut se montrer en défaut pour des bacilles jeunes ou très âgés (133).

— La méthode de Ziehl modifiée par Desbordes, qui utilise une solution de fuchsine tensio-active (par addition de teepol) et évite ainsi le chauffage, donne les mêmes résultats.

— La technique de Mme Alexander exploite la sulfito-résistance des bacilles atypiques : ceux-ci, colorés par la fuchsine comme dans la coloration de Ziehl, ne seront pas décolorés, même après 24 heures, par l'hyposulfite de soude à froid, en solution à 10 %. Cette technique plus fine permet la discrimination :

— bactéries fortement acido-résistantes : colorées en rouge ;

— bactéries faiblement acido-résistantes : colorées en bleu ;

— bactéries non acido-résistantes : colorées en jaune dans la technique d'Alexander-Hauduroy (133), qui recolore par le jaune de métaline après action de l'hyposulfite ; ou en vert dans la technique d'Alexander et Jackson.

— Enfin, la technique de Benda et Urquia (qui combine Ziehl et gram) permet d'apprécier la streptomycino-résistance des bacilles.

Une technique plus récente a pris place, depuis peu, dans la microscopie des bacilles tuberculeux et, bien que controversée, prend de plus en plus d'importance : la coloration par fluorescence.

Certains corps fluorescents : auramine, jaune d'acridine, orangé d'acridine, rhodamine B, se fixent en effet sur les bacilles acido-résistants et leur communiquent la propriété d'émettre des rayonnements lorsqu'on les excite par des radiations de longueurs d'onde convenables. De nombreuses techniques ont été mises au point (techniques de Hagemann, de Hermann, de Hugues, de Degommier [68]). Cette méthode permettrait de mettre en évidence même les bacilles jeunes ou trop âgés, non colorables par la méthode de Ziehl, et les bacil-

les paratuberculeux apparaîtraient moins brillants que les bacilles tuberculeux (13). Cependant, sa spécificité est encore controversée.

D'une manière générale, et mis à part certains détails, ni la morphologie ni les affinités tinctoriales ne sont capables, en toute certitude, de différencier les espèces constitutives du genre *Mycobacterium* (cf. tableaux n^{os} 1 et 2).

CHAPITRE II

CULTURE

A) Les milieux

Ils sont nombreux et variés. Ce sont tout d'abord les milieux classiquement employés pour les cultures de Mycobactéries tuberculeuses :

Loewenstein,

Loewenstein-Jensen,

Dubos,

Dubos au Tween 20, 40, 60 ou 80.

Tous ces milieux servent à l'isolement même des Mycobactéries, et il est apparu nécessaire aux bactériologues de faire le diagnostic de la variété et du type de Mycobactéries. De nombreux auteurs ont essayé de trouver des milieux de culture permettant un isolement sélectif entre les Mycobactéries tuberculeuses et les Mycobactéries atypiques. On s'est vite rendu compte que les Mycobactéries atypiques se développent facilement sur les milieux usuels (111) : bouillon nutritif, bouillon gélosé, voire sur des milieux pauvres : eau peptonée, ou sur milieux synthétiques. Eustatziou utilise les milieux suivants (94) :

Bouillon nutritif : peptone 5 g

extrait de viande 3 g

agar 15 g

extrait de terre 1.000 ml, pH 7

Agar nutritif : bouillon nutritif + 1,5 % agar

Bouillon glycérol : bouillon nutritif + 7 % glycérol

Agar glycérol : agar nutritif + 7 % glycérol.

Mac Millen (192) sépare les souches atypiques de *M. tuberculosis var. hominis* par leur capacité de pousser sur le bouillon Penassay à 37°C et ensuite dans le milieu glycérol-glucose en moins de 10 jours. Des essais ont été faits en gélose nutritive (26), où les bacilles s'y cultivent de diverses façons. Si certains se révèlent en quatre à cinq jours, d'autres apparaissent après des délais aussi longs que ceux exigés par le bacille tuberculeux. Cette culture sur gélose ne présente guère d'intérêt, car on ne peut différencier les bacilles tuberculeux des atypiques.

En effet, il y a quand même intérêt à utiliser, pour l'étude de ces bacilles, les milieux les plus favorables à leur développement et qui sont les milieux glycinés ou glucosés, riches en acides aminés, notamment en asparagine.

Le milieu au thioglycollate (265) provoque une inhibition sélective sur les bacilles tuberculeux humains et bovins. Additionné de bleu de méthylène, ce milieu inhibe la croissance des atypiques, surtout en milieu liquide. Seules les souches *Mycobacterium Kansaii* et *Mycobacterium aquæ* cultivent en milieu solide avec ou sans bleu de méthylène.

B) Multiplication et température d'incubation

La rapidité de culture sur les milieux usuels fait de ces germes des intermédiaires entre la plupart des germes non alcool-acido-résistants et le bacille de la tuberculose.

1° ETUDE QUALITATIVE.

Les Mycobactéries atypiques ont une croissance différente de celle du bacille tuberculeux et ont une exigence thermique peu stricte (de 10 à 40° et à celle du labo). De même, le délai d'apparition des cultures est variable ; *Mycobacterium phlei*, par exemple, pousse en gélose glycinée à + 28°C et donne des colonies bien développées dès le second jour. La température optimum de développement est variable selon les espèces, mais tous ces germes sont susceptibles de se développer à des températures inférieures à + 37° et supportent aisément de gros écarts de température (111). + 28°C est un optimum pour la plupart des espèces.

Mais certaines souches sont également susceptibles de se multiplier à des températures très élevées et Gordon, en 1927, a utilisé le premier cette particularité pour séparer les Mycobactéries en deux groupes : celles qui se multiplient encore à + 47°C et celles qui ne peuvent se développer qu'à une température inférieure à + 47°C.

L'étude de ce critère fut reprise par Penso d'abord, qui fit une classification plus nuancée, en faisant jouer la photo-induction, puis par Gordon et Smith qui divisèrent les Mycobactéries en trois groupes basés sur les limites thermiques de multiplication et la survie à température élevée. Ces classifications furent énoncées au début de la découverte bactériologique de ces Mycobactéries atypiques et, du fait de leur peu d'intérêt en regard des autres moyens de diagnostic, elles sont abandonnées actuellement.

Bien que le délai d'apparition des cultures soit variable, d'une façon générale on peut retenir qu'il est de 11 à 28 jours pour des souches photochromogènes (cr. pigmentation), 12 à 39 jours pour les scotochromogènes (278).

Cette croissance est lente et dysgonique, pour certaines atypiques (47) ; pour d'autres, la croissance est plus rapide et s'effectue en trois à quatre jours. Tout ceci peut les apparenter, par un certain côté, aux bacilles aviaires (les bacilles tuberculeux humains et bovins demandent 10 à 20 jours).

2° ETUDE QUANTITATIVE.

Le principe est de dresser la courbe de croissance d'un bacille donné, simultanément avec les courbes d'autres bacilles. Ces expériences se font à l'aide d'appareils qui enregistrent l'évolution dans le temps, de la densité optique de liquides clairs ou troubles et, notamment, de milieux de culture (type Biophotomètre enregistreur Bonet-Maury-Jouan) (241) et qui donnent une courbe dite de croissance. Peu de travaux ont été faits à ce sujet, mais il faut souligner l'importance de cette étude en rapport avec la morphologie du germe.

C) Aspect macroscopique et pigmentation des cultures

Les colonies sont en général sèches et rugueuses, parfois lisses et humides (comme les bacilles tuberculeux aviaires). Parfois, en milieu de Dubos, on peut constater la présence de formations serpentineuses ou « cord factor », que nous étudierons avec le pouvoir pathogène.

Beaucoup de Mycobactéries sécrètent un pigment jaune, orange ou rouge. Les cultures se pigmentent après exposition à la lumière et éclairage continu, ou à l'obscurité, ou enfin ne présentent aucune pigmentation. On distingue trois groupes de Mycobactéries atypiques :

1. Les *bacilles photochromogènes* produisant un pigment jaune orange, après une courte exposition à la lumière. Parfois, une pigmentation peut se produire à l'étuve, résultant du fait que les portes en sont ouvertes fréquemment. Pour vérifier l'influence de la lumière sur la chromogénèse, il faut exposer à la lumière solaire ou artificielle, pendant une heure, une souche cultivée à l'obscurité et non pigmentée ; 6 à 24 heures après, apparaît une coloration d'un jaune éclatant. La lente accentuation de la couleur résultant de l'exposition à la lumière, et rencontrée spécialement dans les cultures âgées, est un phénomène différent, qui peut se produire dans n'importe quel groupe.

A l'intérieur de ces groupes, on peut distinguer deux types (Timpe et Runyon, en 1954) :

- type 1 : colonies lisses jaune crème passant au chamois après exposition à la lumière ;

- type 2 : colonies rugueuses jaune crème passant au chamois à la lumière, comme le type 1.

2. Les *bacilles scotochromogènes* dont les colonies lisses sont toujours de couleur jaune orange à l'obscurité comme à la lumière. Pour les différencier du premier groupe et éviter des erreurs lors du séjour à l'étuve, on prend soin d'entourer les tubes d'un papier noir.

3. Les *bacilles non chromogènes* qui sont non ou très peu pigmentés (couleur crème ou ivoire).

Cette faculté de pigmentogénèse qu'ont les mycobactéries atypiques fut, pour certains auteurs, l'objet d'une classification (Runyon).

A la suite des travaux de Tolhurst (287), Zettergren (339), Gordon et Smith (121), Leach (117), Sœur Marie-Suzanne, Penso (266), Kushner, Mac Millen, Bozeman (45), Senderi (173), Wells, Agius (323), Tarshis, Wead, Parker (276) et de nombreux autres auteurs qui ont étudié les Mycobactéries atypiques, en n'envi-sageant que l'aspect cultural, morphologique et chromogène, on peut résumer ces caractères dans deux tableaux (tableaux 1 et 2).

CHAPITRE III

BIOCHIMIE

Nous allons nous attacher ici à l'étude de la catalase et des autres enzymes, à l'utilisation des hydrates de carbone en milieu synthétique, au virage globulaire dû au pouvoir réducteur, à la sensibilité éventuelle vis-à-vis de différentes doses de composés chimiques déterminés, et à certains tests biochimiques comme la réduction des nitrates et le test à la niacine.

A) Activités enzymatiques

I. — Catalase

L'activité catalasique des Mycobactéries est une des activités enzymatiques la plus facile à évaluer, qualitativement et quantitativement.

1° TECHNIQUE

a) *Réaction qualitative* : dans un tube à hémolyse contenant 11 gouttes d'eau distillée, on introduit une œse de culture (10 mg); on introduit ensuite 1 cm³ de la solution suivante :

Pyrocatéchine (Prolabo)	0,1 g
Perhydrol 100 ml (")	0,5 cm ³
Tween 80	1,25 cm ³
Eau distillée	100 cm ³

La lecture se fait au bout d'une heure, par mesure de la production de mousse : couronne de bulle +, 1 mm ++, 2 mm +++, plus de 3 mm ++++.

Cette réaction sert aussi à mesurer l'activité des peroxydases (voir test de Vischer).

b) *Réaction quantitative* : La méthode fut mise au point par Finlayson et Edison en 1949, et reprise par Endrejew, Tacquet et Gernez-Rieux en 1956 (3). Cette réaction se mesure en suivant les réactions de la concentration du substrat (H_2O_2) à des intervalles précis et rapprochés.

Dans un ballon placé dans un bain de glace ($0^\circ C$), introduire :

- 5 ml eau oxygénée 0,1 N ;
- 25 ml de tampon PO_4KH_2 , PO_4Na_2H 0,0134 M, pH 6,8 ;
- eau distillée en quantité nécessaire pour amener le volume total à 50 ml, en tenant compte de la suspension bacillaire lavée et refroidie que l'on ajoute au dernier moment.

On prélève 5 ml de mélange que l'on verse dans 5 ml de SO_4H_2 2 N. Des parties aliquotes similaires du mélange sont prélevées et versées dans SO_4H_2 2 N, toutes les trois minutes, pendant 12 à 15 minutes.

On titre ensuite l'eau oxygénée restante de chaque prise avec du permanganate 0,005 N.

On calcule la constante de vitesse de réaction :

$$K = \frac{1}{T} \log_{10} \frac{A}{A - X}$$

(K = constante de la vitesse, T = durée de la réaction en minutes A = ml de permanganate versés au temps 0, A - X = ml de permanganate versés après T minutes).

Ces mesures quantitatives de cette activité sont exprimées en « Kat-f » (Katalase-Fähigkeit de von Euler et Josephson). La Kat-f est calculée d'après l'équation :

$$\text{Kat-f} = \frac{\text{Cte de vitesse (au temps 0)}}{\text{g (poids sec) de bacilles employés dans 50 ml de mélange}}$$

2° RÉSULTATS.

Pour un même milieu, l'activité catalasique (Kat. f.) des souches virulentes de bacilles tuberculeux est assez semblable à celle des bacilles tuberculeux avirulents et même à celle de certains bacilles atypiques. Cependant, d'une façon générale, ces derniers présentent une activité catalasique plus importante (cf. tableau). Ainsi, pour le milieu de gélose au sang autoclavé (aucune activité catalasique), la Kat. f. est de 0,13 pour la souche H37 RV (humain virulent), 0,12 pour le B.C.G., 0,25 pour H37 Ra (humain avirulent), 0,20 pour *M. smegmatis* et de 0,54 pour *M. phlei*.

— *Influence du milieu de culture* : l'activité catalasique peut varier considérablement suivant le milieu de culture. En Dubos elle est plus forte qu'en gélose au sang (*M. phlei* résistant à 100 γ d'INH/ml voit sa Kat. f. passer de 0,5 en gélose à 1,63 en Dubos). Cela provient du fait que, dans le milieu de Dubos, les bactéries sont obligées de synthétiser l'hémine (groupement prosthétique de la catalase) tandis qu'elles la trouvent toute prête dans le second milieu.

— *Souches adaptées à l'INH* : Middlebrook, en 1954 (207), a montré que les bactéries adaptées à l'INH perdent leur activité catalasique et, bien qu'elles soient cultivées par la suite sur un milieu au sang qui favorise nettement leur croissance, elles ne retrouvent pas leur activité catalasique. Il y a lieu de faire une restriction, car certaines Mycobactéries atypiques, résistantes à 1.000-2.000 γ d'INH/ml, donnent lieu à une activité catalasique légèrement affaiblie seulement (*M. phlei*). En repiquant des mycobactéries atypiques chromogènes en milieu de Dubos renfermant 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ d'INH, Viallier (307) constate que l'intensité de l'activité n'était pas modifiée, alors que des souches non chromogènes avaient perdu leur activité.

— *Influence de l'âge des cultures* : Le prélèvement des colonies doit être fait dès les premières manifestations de la culture jusqu'à 6 mois.

— *Influence du pH et de la température* : A pH 7, les bacilles atypiques sont pour la plupart catalase-positifs (252). La catalase, pour certaines Mycobactéries, est labile à la chaleur.

A 70°, *M. tuberculosis*, *M. hominis*, *M. bovis* n'ont plus de catalase, tandis que les Mycobactéries atypiques gardent leur activité catalasique ; *M. avium* peut voir son activité catalasique détruite ou non.

En conclusion, pour les souches tuberculeuses humaines et bovines, il y a étroite corrélation entre la sensibilité à l'isoniazide et leur activité catalasique. Pour les atypiques, elles restent positives au point de vue catalase, même quand on a pu les rendre résistantes à de très fortes concentrations (1.000 µg par cm³) (36) ou qu'elles aient été portées au bain-marie à 70°C. Le diagnostic est orienté par la détermination catalasique : si une souche n'a aucune activité catalasique, elle appartient au groupe des bacilles tuberculeux humains ou bovins ; sinon, elle est du groupe aviaire ou atypique.

II. — Péroxydase

L'activité peroxydasique des Mycobactéries se mesure à l'aide de la réaction colorimétrique basée sur l'oxydation peroxydasique des phénols. Comme la catalase, la peroxydase (également une enzyme héminique) forme dans la cellule des systèmes subsidiaires d'oxydation qui éliminent l'eau oxygénée résultant de l'activité d'autres systèmes. La peroxydase ne décompose pas l'eau oxygénée, mais catalyse, en présence de l'eau oxygénée, l'oxydation d'un grand nombre de phénols aromatiques.

1° DÉTECTION QUALITATIVE.

Elle peut se faire au moyen de deux tests.

a) *Test de Vischer et Tirunarayanan au catechol* (285) : il consiste à verser sur un milieu de culture le mélange suivant :

10 parties de tampon acetate 0,2 M pH 4 ;

2 parties de solution aqueuse de catechol à 2 p. 100 ;

1 partie d'eau oxygénée au 1/100°.

Attendre 18 à 24 heures. Le catechol, sous l'action de la peroxydase, se transforme en produit instable, l'o-quinone, qui donne un produit stable, l'hydroxyquinone, aboutissant à la

formation d'un pigment brun noir, la mélanine. C'est ce pigment qui communique aux bactéries leur coloration foncée. Dans les premières heures de la réaction, la teinte est faible pour passer ensuite au brun rouge (réaction positive) et enfin au noir (réaction +++) à la 18^e heure.

b) *Test d'Andrejew à la benzidine* : il consiste à mélanger les deux solutions suivantes :

— solution de benzidine à 1 p. 100 dans l'acide acétique normal, agitée et filtrée ;

— solution d'eau oxygénée à 1 p. 100 préparée extemporanément, et à verser ce mélange, à parties égales, sur le milieu de culture et en quantité suffisante pour recouvrir toutes les colonies.

Attendre 2 à 15 minutes. Les colonies peroxydase + sont colorées en bleu.

Andrejew a fait une étude détaillée de plusieurs donateurs d'hydrogène (pyrogallol, benzidine, catéchol) et a constaté que le réactif de Vischer s'est révélé le moins satisfaisant ; le test à la benzidine ou au pyrogallol est plus sensible que le test au catéchol qui ne peut distinguer les mycobactéries atypiques des bacilles tuberculeux résistants à l'INH, car ce test est négatif dans les deux cas. Il en est de même indifféremment avec les bacilles tuberculeux sensibles à l'INH ou résistants à l'INH. Il est donc préférable d'employer, pour le test qualitatif, la benzidine qui présente des avantages nets par rapport au catéchol : lecture de la réaction plus rapide d'une part, et d'autre part sensibilité plus grande envers les bacilles tuberculeux.

Les bacilles tuberculeux humains et bovins, sensibles à l'INH, aviaires, les mycobactéries atypiques des différents groupes de Runyon sensibles ou naturellement résistantes à de faibles concentrations d'INH donnent une réaction positive en 10 à 15 mn : colonies bleu foncé ; ainsi que les atypiques à croissance rapide, fortement résistante à l'INH.

Les bacilles tuberculeux humains et bovins fortement ou faiblement résistants à l'INH, ainsi que les bacilles atypiques non photochromogènes, très résistants à l'INH, sont peroxydase-négatifs (les colonies restent de couleur claire, parfois plus ou moins bleutées).

Comme pour la catalase, la peroxydase est détruite pour les mêmes bacilles après un chauffage à 70°C.

2° MESURE QUANTITATIVE.

Elle se fait par dosage électrophotométrique de la purpurogalline produite par oxydation du pyrogallol sous l'action de la peroxydase (procédé quantitatif de Willstätter et Stoll modifié par Summer et Gjessing). Par cette méthode, Andrejew et Coll. (7) constatent que les bacilles tuberculeux résistants à l'INH, contrairement aux bacilles sensibles à l'INH, ne possèdent qu'une activité peroxydasique affaiblie ou nulle.

Chez les Mycobactéries atypiques, l'activité catalasique est généralement plus forte et l'activité peroxydasique nettement plus faible que chez les bacilles tuberculeux humains ou bovins.

La difficulté majeure est de savoir, lors de réactions faibles, si les bactéries ont vraiment une peroxydase, car d'autres dérivés hématiniques tels que la catalase, les cytochromes ou même l'hématine libre, peuvent donner une telle réaction. On sait que la catalase ne décompose pas seulement H_2O_2 mais est susceptible également d'oxyder, aux dépens de l'eau oxygénée, certains alcools (activité peroxydasique de la catalase) de préférence, semble-t-il, aux phénols ou amines aromatiques pour lesquels les peroxydases présentent plus d'affinité. Il faudrait trouver actuellement un inhibiteur susceptible d'inhiber sélectivement toutes les sources secondaires possibles d'activité peroxydasique d'une cellule sans nuire à la peroxydase.

La mesure quantitative se fait ainsi (7) : 2 ml de pyrogallol, 10 ml de tampon phosphate 0,02 M, pH 6 sont mélangés à 1 ml d'eau oxygénée. On ajoute de l'eau distillée q.s. pour 20 ml. Au temps 0, on introduit les bactéries ; on agite le mélange à 20°C, pendant 5 minutes exactement et on ajoute 0,5 ml de SO_4H_2 à 20 p. 100 afin d'arrêter la réaction. La purpurogalline formée est ensuite extraite quantitativement avec un volume connu d'éther. La solution étherée est soigneusement séchée avec SO_4Na_2 anhydre. On dose la purpurogalline à l'aide d'un électrophotomètre, à 430 m μ en se référant à la solution titrée de ce produit.

Lorsque l'activité peroxydasique est à peine perceptible, il faut prolonger la réaction de quinze minutes, avec additions

complémentaires de 0,5 ml de H_2O_2 à 1 p. 100 toutes les cinq minutes (à cause d'une activité catalasique relativement trop forte de ces mycobactéries). Les résultats obtenus sont exprimés en mg de purpurogalline formée pour un poids donné de bactéries en vingt minutes.

Le pyrogallol est préférable au gaïacol, car son produit d'oxydation n'est pas réduit par les mycobactéries peroxydase-positives et permet ainsi les mesures spectrophotométriques, faites en ballons avec les suspensions bactériennes éparées.

Réaction positive → solution orangée plus ou moins foncée (purpurogalline).

Réaction négative → aucun changement de couleur de la solution.

III. — Lipase

Après la première mise en évidence par Canière, en 1901, d'une estérase dans une culture de bacilles tuberculeux, de nombreux auteurs ont confirmé et étudié cette activité en présence d'autres substrats. Après l'huile de ricin par Kendal, Walker, l'huile d'olive par Wells et Corper, et des esters d'acides gras à courte chaîne par Michaelis, Bloch, Matter et Sutter, tous étant des substrats concernant les estérases simples, les Tweens spécifiques des lipases furent introduits par Gamori et Archibald en 1945. Davis et Dubos, en 1948, avec le Tween 80 dans la culture des Mycobactéries, remarquèrent d'une part que l'activité lipasique, en libérant l'acide oléique à partir de cet ester, était nuisible à la multiplication des bacilles tuberculeux dans ce milieu, et d'autre part, que les filtrats de cultures, effectuées en présence de Tween 80 manifestaient dans certains cas (*M. phlei*) une nette activité lipasique. Les Tweens 20, 40, 60 et 80 sont des esters de poly-oxyéthylène sorbitane renfermant respectivement les acides gras suivants : laurique, palmitique, stéarique et oléique.

L'activité lipasique se mesure manométriquement suivant une méthode dérivée de celle de Copenhaver, Stafford et Mc Shan, et chimiquement suivant les indications de Bier et un procédé simplifié adapté par Andrejew, Gernez-Rieux et Tac-

quet (1960) à l'étude des mycobactéries (6). Kölbel a démontré l'activité lipolytique des mycobactéries par le microscope électronique (163). Le Tween 80 est décomposé avec libération d'acide oléique, dont les molécules s'associent pour former des micelles, visibles au microscope électronique sous forme de structures lamellaires périodiques. Il a étudié d'autres substances tensio-actives contenant des acides gras (Spam 60, Mjerj 49) et a constaté qu'elles pouvaient être généralement décomposées par *M. tuberculosis var. avium*.

Les bacilles tuberculeux humains, bovins et aviaires, qu'ils soient virulents ou avirulents, ont une activité lipasique généralement faible : celle des souches bovines et aviaires est en général légèrement inférieure à celle des bacilles humains. Contrairement à l'activité peroxydasique, l'activité lipasique ne présente aucune différence entre les souches sensibles de bacilles tuberculeux et les souches correspondantes adaptées et devenues résistantes à l'isoniazide.

Toutes les souches de Mycobactéries atypiques photochromogènes ont une activité lipasique dix fois plus forte que celle des bacilles tuberculeux. Les non-photochromogènes (type Battey, groupe III) possèdent par contre une activité très faible ou nulle, semblable à celle des bacilles tuberculeux. Les Mycobactéries à « croissance rapide » (groupe IV de Runyon) et scotochromogènes (groupe II) ont une activité qui peut être forte ou faible suivant les souches.

— *Rapports entre l'activité lipasique et la croissance.* La très nette différence d'activité lipasique, faible pour les bacilles tuberculeux et forte pour *M. phlei*, par exemple, pourrait nous faire penser qu'elle pourrait conditionner la croissance plus lente des bacilles tuberculeux (3 à 4 semaines sur bouillon glyciné) par rapport à celle de *M. phlei* (3 jours sur le même milieu) ; pour provoquer une quantité aussi importante de graisse, les bacilles tuberculeux nécessiteraient plus de temps que *M. phlei* puisque leur activité lipasique est 10 à 20 fois plus faible. Ceci n'est pas absolu puisque, dans certains cas, deux souches peuvent avoir une vitesse de multiplication semblable et leur activité lipasique différente. *M. fortuitum*, par exemple, se multiplie aussi vite que les Mycobactéries atypiques photochromogènes, alors que l'activité lipasique est faible dans le

premier cas et forte dans le second. L'activité lipasique ne présente aucun rapport direct avec la croissance.

— *Influence du milieu de culture* : L'activité, pour une souche cultivée sur milieu de Loewenstein, est plus élevée que pour une culture en milieu de Dubos Tween.

— *Influence de la température* : Lorsqu'on chauffe *M. plei* à 100°C pendant 30 minutes, son activité n'est inhibée que de 65 % environ. Koelbel a constaté que si l'on chauffe à 60°C pendant 2 heures, il y a perte d'une certaine activité, et qu'un chauffage à 115°C pendant 15 minutes laisse une certaine activité à la souche intéressée. La lipase serait donc, en faible partie, thermolabile.

— *L'âge des cultures* n'entraîne aucune variation.

— *Hydrolyse des différents Tweens*. Les mycobactéries à faible activité lipasique hydrolysent, pour un même temps, deux fois plus de Tween 40, 60 ou 80. Celles qui possèdent une forte activité lipasique hydrolysent avec une intensité variable les différents Tweens.

— *Activité des estérases simples*. Cette activité (hydrolyse de la tributyrine, de la triacéline) demeure relativement forte pour toutes les mycobactéries, sauf quelques exceptions.

IV. — Amidase

Cette activité enzymatique, variable chez les Mycobactéries, est étudiée par mesure de la quantité d'ammoniaque formée après avoir mis en incubation une certaine quantité de bactéries avec une concentration donnée d'amide (urée, acétamide...) La première amidase trouvée chez les Mycobactéries fut l'uréase par Soehngen dans *M. album*. Depuis, de nombreuses études furent faites et on doit surtout à Bönicke d'avoir expérimenté de nombreuses amides.

1° TECHNIQUE.

Pour avoir une réaction sûre, il faut une grande quantité de germes d'une culture en pleine croissance, de façon à obte-

nir quelques cm^3 d'une suspension à 10 mg/cm^3 . Pour cela, on utilise plusieurs tubes de Jensen ou une culture de Dubos en ballon de 150 cm^3 . Les cultures sur milieu solide sont homogénéisées avec des billes de verre.

— On lave deux fois les cultures en eau physiologique et on centrifuge (3.000 tours/minute) ;

— Puis on dose la quantité d'ammoniaque formée après 4 h et 18 h d'incubation à volumes égaux de 10 mg/cm^3 de bactéries avec une concentration d'amide de $0,00164 \text{ M}$ avec tampon phosphate $\text{pH} = 7,2$ à $\text{M}/30$, à 37°C (pour 1.000 cm^3 , $1,718 \text{ g}$ de PO_4HNa_3 , $12 \text{ H}_2\text{O}$ et $0,254 \text{ g}$ de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$).

— L'ammoniaque est mise en évidence par la méthode colorimétrique de Russel : à 1 cm^3 du mélange bacilles-amide, on ajoute $0,1 \text{ cm}^3$ d'une solution de SO_4Mn , $0,003 \text{ M}$, 1 cm^3 de réactif phénolique et $0,5 \text{ cm}^3$ de solution d'hypochlorite, puis on chauffe 15-20 minutes à 100° . Une coloration bleue traduit la présence d'ammoniaque due à la désamidation.

2° RÉACTIFS.

— Amides :

pour 100 cm^3 d'eau distillée, introduire $9,84 \text{ g}$ d'urée ou 20 mg de nicotamide, ou $9,68 \text{ mg}$ de acétamide ou $19,85 \text{ mg}$ de benzamide, ou $20,2 \text{ mg}$ de pyrazinamide, ou 19 mg de succinamide.

— SO_4Mn :

$66,9 \text{ mg}$ de SO_4Mn , $4 \text{ H}_2\text{O}$ pour 100 cm^3 d'eau distillée.

— Réactif phénolique :

25 g d'acide phénique versés dans 10 cm^3 d'eau distillée. Agiter fort, puis ajouter 54 cm^3 de soude NaOH , 5 N (20 g dans 100 cm^3 d'eau distillée) que l'on dissoudra complètement. Compléter à 100 cm^3 . Conserver le réactif dans un flacon brun.

— Hypochlorite :

à 25 g de chlorure de chaux (Cl_2CaO) dans 300 cm^3 d'eau distillée chaude, ajouter en agitant 135 cm^3 d'une solution à $20 \text{ p. } 100$ de CO_3K_2 . Faire bouillir quelques minutes

pour éliminer l'ammoniaque. Refroidir et s'assurer qu'il reste encore des ions calcium. Compléter à 500 cm³ avec de l'eau distillée. Filtrer. A conserver en flacon brun dans la glacière.

3° RÉSULTATS.

L'activité uréasique est très élevée chez les Mycobactéries à croissance rapide (*M. smegmatis*, *phlei*). *M. avium*, *ulcerans* et une partie des souches photochromogènes. Les bacilles tuberculeux humains et bovins hydrolysent l'urée.

En ce qui concerne le méthylurée et l'éthylurée, seuls *M. phlei* et quelques souches de *M. smegmatis* sont susceptibles de dégrader ces amides. De même, seul *M. smegmatis* peut dégrader le formylurée (35).

Les résultats des travaux de Viallier (398), Singer et Cysner (264), de Bönicke (33 - 38 - 39 - 40 - 41 - 42), de Toda (286) et de Juhlin (155) permettent de dresser un tableau sur les caractères amidasiques des principales espèces de Mycobactéries.

	Urée	Acét.	Benz.	Nicotin.	Carbamide	Succinam.	Pyrozinam.
B. humain ..	+			+			
B. bovis	+			—			
M. avium	—	—	—	+		—	+
M. smegmatis.	+++	faible	+	+	+	+	+
M. phlei	++	—	—	+	+	—	+
M. ulcerans ..	—	—	—	faible		—	+
M. balnei					+	—	
Photoch. kansasii ...	+	+	—	+		—	—
Scoto. aquae..	—	—	—	—	—	—	+
Non photo. Type Battey ..	—	—	—	+		—	—

Tous les photochromogènes ont la même activité acétyl-amidasique : urée +, nicotinamide +.

V. — Arylsulfatase

Ce test d'activité de l'arylsulfatase, récemment découvert, ne permettrait, au début, que la différenciation des souches humaines, bovines et aviaires de toutes les autres souches de Mycobactéries ; on ne pouvait différencier les bacilles atypiques entre eux (318). Ce test, proposé par Whitehead, consiste à employer du disulfate tripotassique de phénol-phtaléine à des concentrations de 0,0005 M à 0,001 M dans du bouillon d'albumine de Tween. L'arylsulfatase est détectée en ajoutant une solution alcaline de sodium, qui donne la couleur rouge du sel disodique de phénolphtaléine. La réaction peut être lue au bout de deux semaines (170).

Les bacilles tuberculeux aviaires peuvent être distingués avec fidélité des souches Battey en se basant sur leur activité d'arylsulfatase, après deux semaines d'incubation en présence d'une substance de base (171). Les bacilles aviaires ne présentent aucune activité au bout de deux semaines, soit avec des concentrations de 0,001 M à 0,002 M de phénolphtaléine, tandis que les souches Battey sont arylsulfatase-positives à la première et deuxième semaine, que ce soit avec des concentrations de 0,001 M à 0,002 M. Une incubation de deux ou trois jours à des concentrations de 0,001 M permet de distinguer *M. fortuitum* (+) des atypiques à croissance rapide et parfois des bacilles atypiques du groupe IV de Runyon (172).

VI. — Autres activités enzymatiques

De nombreuses études ont été faites sur les enzymes des mycobactéries atypiques, mais ne permettent pas encore, à l'heure actuelle, une différenciation précise au sein des Mycobactéries atypiques, ni même entre *M. tuberculeuses* et *M. atypiques*.

Certaines mycobactéries contiennent une enzyme catalysant la formation d'ammoniaque à partir de formamide (209). Ce caractère ne se retrouverait que chez certaines bactéries. Pour Nagayama, Konno et Oka, ce serait une enzyme spécifique qu'ils nomment « formamidase ».

D'autres bactéries possèderaient une endophénoloxydase (232).

Les Mycobactéries peuvent se différencier suivant leur activité pénicillinasique (36). Les plus actifs producteurs sont *M. lacticola*, *smegmatis*, puis *M. phlei*. Les bacilles tuberculeux sont faiblement pénicillinase-positifs. Les bacilles tuberculeux aviaires et atypiques auraient l'activité la plus réduite. Ce test n'a qu'une valeur limitée.

B) Utilisation des hydrates de carbone en milieu synthétique

Cette étude faite par Mac Millen et Kushner (193) peut être résumée dans le tableau suivant :

	Acétate	Succinate	Propionate	Malate	Pyruvate	Lactate	Citrate	Oxalate	Tartrate	Benzoate
<i>M. fortuitum</i> ...										
<i>M. smegmatis</i> ...										
<i>M. balnei</i>										
<i>M. marinum</i>										
<i>M. phlei</i>										
<i>M. thamnopheas</i> .										
<i>M. kansasii</i>	+				+					
<i>M. scrofulaceum</i> ..	+	+	+	+	+	+				
<i>M. marianum</i>	+			+	+					
<i>B. tub. humain</i> ..										
<i>B. paratuberc.</i> ..										
<i>B. tub. aviaire</i> ..	+									
<i>B. tub. bovin</i> ...	+		+	+		+				

C) Virage globulaire

Cette réaction, basée sur l'action réductrice des bactéries, consiste à mettre des émulsions microbiennes en présence de sang : la coloration rouge vif de celui-ci vire alors au violet (181, 182). Dans un tube contenant 4 à 5 cm³ de bouillon citraté à 1 p. 100 et additionné de 1/20^e de sang citraté, on verse la suspension bactérienne et on laisse en contact à l'étuve, à la glacière ou à la température du laboratoire. Le virage globulaire obtenu après 6 à 24 heures à l'étuve disparaît par refroidissement, mais renaît peu à peu après réchauffement du liquide. Des émulsions opaques contenant 5 à 10 mg de germes donnent un virage en 10 à 20 minutes à 37°C. A froid, le virage ne rétrograde pas, si ce n'est à la glacière. Après chauffage à 60°C pendant une heure, toute action réductrice a disparu, même pour les bouillies épaisses. Lévy avait étudié ce virage au début, en considérant les Eubactéries aérobies et les Corynébactéries d'une façon générale, puis en ne considérant que les Mycobactéries. Le bacille tuberculeux ne provoque aucun virage, quelle que soit la durée à l'étude et la densité des émulsions, alors que toutes les autres mycobactéries donnent un virage globulaire.

Ce test n'a aucune valeur s'il est employé seul, mais à l'aide d'autres tests, peut éviter la confusion d'un bacille tuberculeux avec un bacille atypique.

D) Antibiosensibilité

Les recherches de la sensibilité ou de la résistance éventuelle vis-à-vis de certains composés chimiques comme les antibiotiques, les produits chimiothérapiques, sont nombreuses. En ce qui concerne l'antibiosensibilité, un grand nombre d'antibiotiques furent testés, en particulier tous les tuberculo-statiques communément employés en clinique. A ce propos, nous pouvons retenir quelques faits essentiels :

— D'après les travaux de Schatz et Waksman repris par Hauduroy et Rosset, la streptomycine ne permet aucune distinc-

tion valable entre les Mycobactéries : la multiplication microbienne est inhibée par des concentrations inférieures à 10 µg/ml (111). De plus, une concentration donnée de streptomycine a une action inhibitrice d'autant plus marquée qu'elle est introduite précocément dans le milieu de culture (297).

— L'action de l'acide p-amino-salicylique a permis de constater que le développement des bacilles tuberculeux humains et bovins est stoppé généralement en présence de 5 µg de P.A.S. par cm³ de milieu (72,188). La dose limite serait de 100 µg pour le bacille aviaire (54), tandis que les bacilles atypiques se multiplient même avec des concentrations d'au moins 1.000 µg/ml.

— La sensibilité à l'hydrazide de l'acide nicotinique (INH) pour les bacilles tuberculeux est aussi intense que celle montrée envers la streptomycine (187) (0,1 µg/ml). Les bacilles atypiques sont moins sensibles (10 µg/ml à 100-400 µg/ml) (Travaux de Lutz, Viallier et Brun). Cependant, certaines souches pathogènes, tuberculeuses ou non, peuvent être résistantes à l'isoniazide. A la suite de cette adaptation à l'isoniazide, de nombreuses souches de mycobactéries ne manifestent plus aucune activité catalasique ou peroxydasique, mais, à l'inverse, il a été démontré qu'il n'y avait aucune relation entre l'isoniazide-résistance et l'activité catalasique (335). On peut se demander si cette adaptation à l'isoniazide inhibe également la formation d'autres enzymes ou co-facteurs importants, à groupement actif contenant du fer, notamment la formation de la cytochrome-oxydase et des cytochromes. Andrejew et ses collaborateurs répondent par la négative, car ils ont trouvé des souches INH-résistantes chez les mycobactéries atypiques à croissance rapide, possédant tous leurs cytochromes : a, b, c, d, une activité catalasique assez forte (7) et une activité cytochrome-oxydasique (5 - 15).

— La thiosémicarbazone de la para-acétylaminobenzaldehyde (TB1) est fortement inhibitrice pour les bacilles tuberculeux (189) alors que pour des bacilles atypiques comme *M. smegmatis*, leur croissance n'est pratiquement pas inhibée par des taux relativement élevés de TB₁ (> 100-200 µg/cm³), alors que celle des bacilles tuberculeux l'est à 0,2-0,4 µg/cm³.

Viallier (314) remarque que la 4-4'-diisoamyloxythiocarbonylure est active sur les mycobactéries tuberculeuses à une dose

inférieure à 10 g/cm^3 , alors que, pour les atypiques, la bactériostase ne se manifeste le plus souvent qu'au-delà de $10 \text{ }\mu\text{g}$. L'érythromycine à la concentration de 5 à $10 \text{ }\mu\text{g/cm}^3$ inhibe les mycobactéries photochromogènes et non photochromogènes et, à des concentrations plus élevées, les bactéries scotochromogènes (125).

La Terramycine, la Néomycine et la Novobiocine n'ont aucune action sur les *M. photochromogènes* (292).

Les résultats donnés par les divers antibiotiques peuvent être classés dans un tableau synoptique, à la suite des travaux de Leach et Fenner (177), Tarshis, Weed (276), Wells, Agius (323), Viallier (313), Rogul (246), Kushner (173), Pollak (234), Zettergren (339), Urbancik (292), etc...

A côté des antibiotiques, on peut mentionner l'action de certaines substances : la soude à 4 p. 100 en particulier est très nuisible aux cultures de mycobactéries atypiques à croissance rapide, lorsque le traitement dépasse une demi-heure (93).

— De même, les bacilles atypiques et aviaires restent vivants après 6 jours de contact avec le yaourt, alors que l'action bactéricide du yaourt se manifeste en 18-24 heures sur les mycobactéries humaines et bovines. Cette activité n'est pas due à la nizine ; elle disparaît après neutralisation, mais n'est cependant pas liée directement à l'acidité (273).

E) Tests biochimiques de différenciation

Nous n'envisagerons dans ce chapitre que la réaction de Konno (production de niacine) et la réduction des nitrates. Les colorations vitales seront étudiées dans le chapitre « Tests cytochimiques de virulence ».

I. — Test de la niacine : réaction de konno

Cette réaction, basée sur la production de niacine, permet d'identifier les bacilles tuberculeux humains.

Konno (164, 165) fut le premier à décrire un test de la niacine, en conseillant de pratiquer l'épreuve directement sur

une culture, en milieu de Dubos, âgée de 10 jours au moins et titrant environ 1 mg de germes au cm³. L'amide nicotinique, concentrée au départ dans les bacilles, diffuse dans le liquide et, en présence d'aniline et de bromure de cyanogène, développe une coloration jaune dans le mélange.

Bönicke, en 1959, préconise une nouvelle technique, n'exigeant plus le bromure de cyanogène et sur des cultures âgées de 3-5 semaines en milieu liquide (type Youmans), tuées par un chauffage à 100° pendant 2 heures : il réalise la réaction de Peknice (CNK et chloramine T) si le liquide est incolore, et la réaction d'Asmus-Garschagen (acide barbiturique) si le liquide est jaune (31). D'autres auteurs présentèrent des modifications du test (Runyon et Sélin 250), mais la plupart des recherches portent sur les réactifs associés au bromure de cyanogène.

Gutierrez-Vasquez (124) propose un microtest utilisant comme réactif une solution alcoolique de o-toluidine à 1,5 % associée au bromure de cyanogène à 10 %, puis Runyon (250), Medweczy, Mandler (196 - 204), une solution alcoolique de benzidine à 3 %. Matejka (203) essaie comparativement : aniline, o-toluidine, benzidine et chloramine, et conclut à l'intérêt de la benzidine.

Enfin, Barreto et Lorian (16), en utilisant le PAS comme réactif, associé au BrCN, obtiennent de meilleurs résultats dans l'identification des bacilles tuberculeux d'origine humaine.

Konno recommandait, pour exécuter ce test, d'avoir des cultures en Dubos-Bönicke, en Youmans-Marek, en milieu à l'œuf sans vert malachite ; Runyon, Merle et Hanis exécutent l'épreuve sur le lavage de la culture, en milieu solide ; Boisvert sur des cultures en milieu solide, en milieu liquide et à partir de colonies détachées.

De ces études il ressort que la technique à partir de colonies détachées est peu sensible et que toute réaction négative doit être vérifiée par les autres méthodes (27). Les cultures sur gélose de Dubos et de Kirchner conviennent très bien, mais non la gélose à base de bouillon nutritif. Pour avoir une réaction précoce et sensible, les milieux liquides de Dubos ou de Youmans sont les milieux indiqués (312-311).

TECHNIQUE :

Dans les tubes de culture sur milieu de Jensen, on introduit 0,5 cm³ d'une solution d'aniline à 4 % dans l'alcool à 96° ; on attend 10 mn, puis on ajoute 0,5 cm³ d'une solution de bromure de cyanogène à 10 % dans l'eau distillée.

(Pour les milieux liquides de Dubos et Youmans, introduire 1 cm³ de chaque solution).

On lit immédiatement car la pigmentation s'atténue rapidement.

RÉSULTATS :

Cette réaction, pour qu'elle soit fidèle, exige des cultures sur Jensen âgées d'un mois et assez abondantes, ou des cultures en Dubos de deux semaines bien développées.

- Culture âgée abondante : colonies jaunes, liquide jaune
++++.
- » 1 mois abondante : colonies jaunes, liquide jaune-vert +++.
- » 3 semaines : colonies peu colorées, liquide vert-jaune ++.
- » pauvre ou culture bovine âgée (même dysgonique) : colonies non colorées, liquide vert avec nuance jaune +.

Ces résultats sont donnés pour des bacilles tuberculeux humains. Dans les autres cas, les colonies ne sont pas colorées et le liquide est vert.

La méthode de Konno (Bromure de cyanogène + aniline) mérite d'être retenue ; cependant, on pourrait employer la variante CNBr + benzidine, qui donne les mêmes résultats, mais aussi une réaction positive plus intense jamais suivie de décoloration. La présence du vert malachite ne gêne pas la lecture de la réaction.

II. — Réduction des nitrates

Le pouvoir réducteur des Mycobactéries fut utilisé comme nouvelle méthode d'identification. Virtanen a fait une étude très complète de la réduction des nitrates en nitrites (317).

TECHNIQUE :

Dans un tube à hémolyse renfermant 1 g d'eau distillée, on introduit 5 cm³ de culture ou une oese de culture sur Jensen (10-15 mg). On verse 2 cm³ de la solution NO₃Na N/100 en tampon phosphate 7 (NO₃Na : 0,085 g, PO₄H₂K : 0,117 g, PO₄HNa₂-12 H₂O : 0,485 g ; eau distillée : 100 cm³). Après deux heures à l'étuve à 37°C, on ajoute 1 goutte d'HCl concentré, 11 gouttes d'une solution de sulfanilamide à 0,2 p. 100, 11 gouttes de chlorhydrate de N-(1-naphtyl)-diéthyl-propylènediamine à 0,1 p. 100. On mélange ; la lecture se fait quelques minutes après :

— Réaction positive : rouge amarante foncé +++.

» » moins intense ++.

— Réaction douteuse : rouge amarante faible +.

— Réaction négative : rose ou non colorée 0.

RÉSULTATS :

Virtanen a montré, par une étude quantitative, que toutes les Mycobactéries étaient susceptibles de réduire les nitrates, mais à des degrés divers. Lors de la réaction qualitative, seules les souches ayant une forte activité réductrice réagissent positivement ; mais, d'après les travaux de Boisvert (28), de Bönicke (34) et de Viallier (310), qui confirment les résultats de Virtanen, sont réducteurs, en plus des bacilles tuberculeux humains : les bacilles atypiques photochromogènes et à croissance rapide (*M. kansasii*, *M. smegmatis*, *M. phlei*, *M. fortuitum*) ; sont négatifs les bacilles tuberculeux bovins : *M. ulcerans*, *M. balnei*.

Les souches aviaires, non photochromogènes et scotochromogènes, sont le plus souvent négatives, mais certaines réagissent positivement. L'épreuve de réduction des nitrates, prati-

quée sur des cultures en pleine croissance, est facile à mettre en œuvre.

L'utilisation systématique du test de la niacine et du test de la réduction des nitrates permet une identification très satisfaisante des souches de Mycobactéries isolées.

Pour une bonne exécution de ce test, les cultures utilisées devront avoir un développement suffisant et le temps de séjour à l'étuve ne devra pas être diminué ; de même qu'il ne faudra pas tenir compte des colorations légères.

CHAPITRE IV

BIOLOGIE

A) Pouvoir pathogène et virulence

Etudier le pouvoir pathogène, c'est mettre en présence la souche microbienne à étudier et le « réactif » vivant. Des interactions entre la bactérie et son hôte, on déduira l'importance de son pouvoir pathogène vis-à-vis de cette espèce et de cette espèce seule.

La virulence est une qualité d'ordre beaucoup plus général. Pour Hendersen, « être virulent, c'est être poison ». Pour Hauduroy, on peut grouper sous le chapitre virulence l'un des résultats des nombreuses propriétés physiologiques d'une souche microbienne. Cette souche manifeste sa croissance et sa vie en fabriquant des enzymes qui peuvent détériorer, désintégrer ou assimiler des substances diverses, en sécrétant des produits diffusibles ou non pouvant jouer le rôle de poison.

Si une souche isolée se révèle apte à provoquer une maladie chez un animal, on la déclare pathogène pour cet animal et on lui attribue le caractère de virulence. Si aucun animal sensible n'est découvert, on ne peut pour autant en infirmer la qualité de virulence.

I. — Pouvoir pathogène in vivo

Le caractère pathogène d'un germe est fonction, pour une espèce animale donnée, de la voie d'administration, et est influencée par la nature de la substance accompagnant la souche microbienne.

Lydia Rabinowitsch, en 1897, après la découverte d'un bacille atypique dans le beurre, constata que, lorsqu'on inoculait des cobayes avec le beurre infecté par ces cultures, les lésions étaient plus apparentes que celles produites par des injections de cultures pures. Elle s'aperçut aussi que les lapins et les souris blanches semblaient réfractaires.

Piéttri, au cours d'une étude sur le pouvoir pathogène expérimental de bacilles acido-résistants rencontrés dans du beurre à Berlin, observa pour la première fois le rôle activant des substances grasses sur les « lésions paratuberculeuses ». De nombreux auteurs ont repris ce problème en recherchant l'influence de corps gras divers et même de substances chimiquement différentes des graisses neutres, mais présentant des qualités voisines telles que l'huile de paraffine : Hagan et Lévine (126) constatèrent que les suspensions huileuses de bacilles atypiques, administrées par voie intrapéritonéale au Cobaye, tuaient ces animaux et permettaient le développement de lésions pulmonaires. Toute se passe comme si les bacilles en solution huileuse étaient protégés des cellules et des tissus, alors que ceux en suspension aqueuse seraient directement exposés à ces influences.

Laporte (174) développa ces études des substances grasses en faisant varier les modes d'introduction des germes (S/C, IV, IP, I-ganglionnaire), les animaux d'expérience (cobaye, lapin, poule), et en recherchant notamment l'action d'injections, par voies différentes, de germes activateurs et d'huile de paraffine. L'action activante que des substances de même nature physique que les graisses, et spécialement l'huile de paraffine, exercent, peut aussi se manifester sans qu'il soit nécessaire d'inoculer l'huile et la culture mélangées. Certaines substances non grasses, mais douées de propriétés irritantes, sont aussi susceptibles d'aggraver les lésions produites (kaolin, poudre de lycopode).

Lorsque les bacilles et l'huile sont introduits par des voies différentes, tout se passe comme si l'huile avait la propriété de fixer les bacilles circulants dans tous les points de l'organisme où elle se trouve, les lésions s'installant au point de rencontre huile-germe. Cependant, un rôle très faible doit être accordé à l'action toxique propre de l'excipient ; ce dernier intervient en favorisant la dissolution de composés toxiques

bactériens de nature vraiment protidique ou polysaccharidique et en permettant la multiplication *in vivo* de bacilles normalement inaptes à végéter dans les tissus vivants.

Géronimus et Birkeland pensent que le pouvoir pathogène serait lié à la plus ou moins grande facilité avec laquelle les germes oxyderaient certains substrats existant dans les tissus de l'hôte.

« La marche de l'infection n'est jamais progressive ; elle n'entraîne pas la mort et les lésions ne sont pas transmissibles » (Laporte). L'après les expériences faites au laboratoire, il ne semble pas que cette phrase de Laporte soit vérifiée pour toutes les *Mycobactéries* atypiques, et tout dépend de l'animal choisi.

De plus, chaque espèce de *Mycobacterium* entraîne des lésions plus ou moins spécifiques et éventuellement la mort.

— Chez la Souris, *M. kansasii* ainsi que *M. fortuitum* provoquent une mort fréquente.

Par voie intraveineuse, les lésions macroscopiques obtenues après inoculation de doses moyennes (0,2 mg) sont rares, mise à part l'hypertrophie splénique ; les bacilles se multiplient et persistent dans les viscères, surtout le poumon et la rate. On peut les retrouver même après une survie de 12 à 15 jours (316). *M. kansasii* persiste dans les viscères avec une régularité plus grande que *M. aquae*.

Par voie intrapéritonéale, la rate, le poumon et les reins sont régulièrement le siège de la culture de la mycobactérie. *M. kansasii* est doué d'une activité pathogène certaine et se multiplie au niveau des viscères. Au contraire, *M. aquae* ne persiste que peu, en particulier au niveau des reins.

M. fortuitum donne des lésions identiques à *M. kansasii* (173). *M. smegmatis* ne provoque ni lésion chez la souris, ni mort même avec des injections en suspension de paraffine. *M. ulcerans* donne des lésions cutanées et a un pouvoir pathogène qui dépend de la température de la région où les bacilles sont introduits et peuvent se localiser (97). Par des inoculations intrapéritonéales, associées à l'huile de paraffine, on a pu observer des lésions méningées caractéristiques, et même cérébrales (43).

— Cobaye : Animal de choix pour le bacille tuberculeux, il a été peu employé pour tester les mycobactéries atypiques. Par voie sous-cutanée, avec une souche chromogène (312), on obtient un abcès local en deux semaines, avec participation du ganglion satellite. Les lésions sont discrètes et aucun germe n'est présent dans les organes internes (112). La voie intrapéritonéale, associée à la paraffine, peut donner des lésions internes et même provoquer la mort des animaux (43). L'adjonction à la suspension microbienne, de virus grippal, n'exacerbe pas du tout la virulence du germe, comme on l'avait pensé (112). Le Cobaye est insensible à *M. fortuitum* (173).

— Poule : Les lésions inconstantes et discrètes trouvées après inoculation par voie intraveineuse, sont localisées au foie et à la rate. Après inoculation de 1 à 5 mg de culture (14) à des poules âgées de 6 à 8 mois, on ne trouve pas de lésions sur l'intestin. On ne note aucune sensibilité vis-à-vis de *M. balnei*.

— Lapin : Après inoculation intraveineuse, les lésions sont discrètes et inconstantes.

— Hamster : Il est sensible aux bacilles photochromogènes (112), en particulier à *M. balnei* (330).

— Embryon de Poulet : *M. ulcerans* et *M. phlei* (99) ne provoquent la mort du poussin que si la température est maintenue à 33°C et non à 37°C.

— Le Singe rhésus ne présente qu'une faible sensibilité aux bacilles photochromogènes. Par voie intra-trachéale, et à des doses élevées, on peut obtenir des infiltrations pulmonaires étendues, décelables par radiographie, deux semaines après l'inoculation (257).

La virulence expérimentale sera recherchée par inoculation :

- chez le Cobaye (C), de 10^{-2} mg de bacilles, par voie sous-cutanée ;
 - chez le Lapin (L), de 10^{-2} mg par voie intraveineuse ;
 - chez la Souris (S), de 1 mg par voie intraveineuse ;
 - chez la Poule (P), de 1 mg par voie intraveineuse ;
- (cf. tableau récapitulatif).

II. — Appréciation du pouvoir pathogène *in vitro*

Elle n'est qu'approchée, d'orientation, et ne saurait supplanter les tests *in vivo*, de référence systématique.

1° ASPECT MORPHOLOGIQUE EN CULTURE

Pour Koch, les bacilles cultivés sur sérum apparaissent sous forme de « ...lignes fines et arquées plusieurs fois ; les plus petites ont le plus souvent la forme d'un S, les colonnes les plus longues montrent les sinuosités les plus variées, en forme de serpent... ». Ces formes sinueuses furent appelées « cords » ou formations serpentine par les Américains, « moustaches tordues » par Metchnikoff.

Middlebrook, Dubos et Pierce, en 1947, firent les premiers une relation entre la forme torsadée et le pouvoir pathogène « Plus grand est le pouvoir pathogène, plus serrés sont les éléments des torsades ».

Cependant, Suter et Dubos montrèrent que lorsqu'une souche pathogène pour les Mammifères est conservée par repiquages successifs, il arrive souvent que le pouvoir pathogène aille en s'éteignant, tandis que les formes serpentine ne sont pas modifiées, la culture gardant une morphologie toujours semblable. De même, Dubos remarque que l'adjonction de « Tween 80 » à un milieu synthétique empêche la formation de torsades et favorise la dispersion des germes. Abaisser la proportion de Tween 80 permet de faire réapparaître ces formes torsadées. Il faut noter cependant que le fait d'ajouter du Tween 80 en faible ou grande quantité ne modifie en rien le pouvoir pathogène du germe.

Bloch reprend ces données, en 1950, et admet deux explications concernant l'orientation des bacilles virulents :

— une raison physique : la charge électrique des bacilles tuberculeux virulents est nettement plus grande que celle des bacilles non virulents, la polarité de charge entraînant l'orientation des mycobactéries ;

— une raison chimique : par un produit de sécrétion des bacilles, surtout abondant dans les formes jeunes, capable

d'exercer un effet toxique, cytolytique sur les phagocytes. Il isole cette substance appelée « cord-factor ». Ce facteur, ajouté à des cultures avirulentes, leur donne le pouvoir d'inhiber les leucocytes *in vitro*.

Si l'on ne peut expliquer tout le pouvoir pathogène par le « Cord factor », celui-ci éclaire un domaine particulièrement obscur ; mais on ne peut affirmer qu'il représente le seul facteur responsable de ce pouvoir pathogène.

Chez les Mycobactéries atypiques, la présence de torsades dans les cultures est irrégulière (136, 214) et peut être étudiée sur milieu de Loewenstein, ou en milieu liquide additionné de sérum sanguin (304). Les résultats, chez les principales Mycobactéries atypiques, sont consignés dans le tableau suivant :

	<i>Aspect en Youmans</i>	<i>Cordes en Youmans</i>
<i>M. ulcerans</i>	granuleux	0
<i>M. kansasii</i>	granuleux	cordes lâches ±
<i>M. blanei</i>	granuleux	
<i>M. smegmatis</i>		
<i>M. aquae</i>	homogène ou granuleux	0 rarement
<i>M. avium</i> var. suis type Battey	homogène	0
<i>M. fortuitum</i>	granuleux	0

2° ETUDE PAR DES MOYENS PHYSIQUES.

L'étude des germes aux rayons X a confirmé l'existence d'une zone périphérique organisée en réseaux atomiques, variables avec la virulence des germes, les plus virulents ayant l'architecture cristalline la plus complexe et la mieux définie (études de Paraf, Desbordes et Fournier).

De même, l'observation au microscope électronique des bacilles fut entreprise par Werner en 1951-1952. Les bacilles virulents ont un aspect tacheté alors que les bacilles avirulents se présentent en amas d'aspect opaque uniforme. Xalabarder

étudie des souches de bacilles de Koch et confirme les études de Werner. Cependant, les interprétations furent vivement critiquées par Lépine en 1955. Il semble que les difficultés de l'observation au microscope électronique ne permettent pas de conclure d'une manière absolue sur la structure intime des Mycobactéries.

D'après Xalabarder, les souches virulentes de bacilles tuberculeux sous la lumière de Wood conservent leur couleur crème pâle, tandis que les souches avirulentes montrent des fluorescences diversement colorées, mais toujours intenses. Ainsi, *M. tuberculosis* a une coloration variant du rose saumon à l'indigo alors que *M. smegmatis* a une fluorescence jaune d'or et *M. phlei* une fluorescence crème.

Il existe probablement, à la périphérie des germes, une organisation moléculaire lipidique spéciale de germes très virulents, cette structure n'étant pas retrouvée chez les bacilles avirulents.

3° ETUDE EN CULTURES DE TISSU.

Après inoculation d'animaux de laboratoire et sacrifice au bout de trois jours, on fait un prélèvement de rate, qu'on met ensuite sur culture de tissu. Arima et ses Collaborateurs mesurent le degré de virulence en mesurant le coefficient d'accroissement des bacilles maintenus 3 jours à l'étuve, en présence de cellules tissulaires vivantes. Ils pratiquèrent ce test sur le Cobaye, après inoculation de 10^7 u. vivantes de bacilles, par voie sous-cutanée, et sur la Souris après inoculation par voie intraveineuse. Le sacrifice est pratiqué 7 semaines après. Cette virulence, évaluée par la méthode des cultures de tissu, est en général très faible, mais, pour certaines souches, elle paraît presque aussi forte que celle des souches virulentes humaines ou bovines (8, 9).

4° TESTS CYTOCHIMIQUES DE LA VIRULENCE. COLORATIONS VITALES

Ces épreuves permettent, en utilisant certaines colorations, de tester *in vitro* la virulence du germe. Que l'on s'adresse au

rouge neutre, au bleu de Nil ou aux colorants de Wilson, les méthodes diffèrent essentiellement par le principe suivant :

— les unes s'adressent à divers composés lipidiques situés à la périphérie des germes (acide mycolique, lipo-polysaccharides azotés). Elles sont valables aussi bien pour des germes tués que pour des germes vivants, puisqu'il s'agit de fixer le colorant sur une structure chimique préétablie. Ce sont les méthodes de Dubos au rouge neutre et de Desbordes au bleu de Nil ;

— les autres, ou plus exactement celle de Wilson, s'adresse à un système diastasique représenté par une déshydrogénase ; elle n'est donc compatible qu'avec la vie du microbe.

a) *Test de Dubos au rouge neutre.*

C'est Dubos et Middlebrook qui, les premiers, ont mis au point une réaction colorée mettant en évidence la virulence des Mycobactéries (86). Cette réaction a été introduite en France par Hauduroy et Pasternak-Gallia (132).

— *Principe de la méthode* : il est basé sur la mise en évidence des lipides périphériques par un colorant, le rouge neutre ayant une action élective sur ces lipides.

— *Réactif* :

Rouge neutre en solution aqueuse à 1 pour 1.000, pH 8,9.

Alcool méthylique à 50 %.

Solution tampon pour avoir pH exact :

1 g de chlorure de sodium,

1 g de barbiturate de sodium,

100 ml d'eau distillée.

Cette solution provoque un virage au jaune du rouge neutre.

— *Technique* : on prélève deux oeses de germes dans une culture sur milieu de Loewenstein en plein développement. On émulsionne les bactéries dans quelques centimètres cubes d'eau physiologique et on centrifuge pendant 10 minutes.

On reprend le culot bactérien avec quelques centimètres cubes d'alcool méthylique à 50 % ; on laisse agir pendant 15-20

minutes en ayant soin de bien émulsionner les corps bactériens. On lave deux fois, puis on rejette soigneusement le surnageant.

Traitement du culot bactérien : on ajoute 2 à 5 cm³ de la solution tampon à laquelle on ajoute 3 gouttes de la solution filtrée de rouge neutre ; le liquide prend alors une teinte orangée. Après émulsion, on laisse sédimenter et on procède à la lecture de la réaction au bout d'un temps variable allant de 5 à 30 minutes.

— *Lecture* : il suffit de noter la couleur prise par le culot bactérien (le liquide surnageant restant dans tous les cas jaune orangé).

Culot bactérien rouge carmin : Mycobactéries virulentes ;
rose : Mycobactéries atténuées ;
jaunâtre : Mycobactéries avirulentes.

Dubos note une concordance de réactions sur les souches de bacilles tuberculeux humains et bovins (culot rouge carmin). Hauduroy constate que les Mycobactéries atypiques sont colorées en jaune après un délai de 30 minutes, et que cette réaction semble indépendante du milieu de culture (Loewenstein, Dubos, milieux ordinaires). *M. ulcerans* donnerait une réaction positive et *M. phlei* une réaction négative (117 bis).

— *Améliorations apportées à la méthode* : Viallier, Tigaud et Kall ont mis au point une méthode d'analyse spectroscopique permettant une meilleure détermination des souches, en envisageant seulement la limite d'adsorption du côté du rouge. Ils ont pu ainsi, avec une seule longueur d'onde, obtenir un chiffre plus objectif qu'une simple appréciation de coloration (315).

Ces mêmes auteurs ont mis au point une méthode de coloration sur lame à partir de bacilles cultivés sur milieu de Loewenstein, les dispensant ainsi de pratiquer un lavage au méthanol.

Ce test fut combiné, par Tarshis, avec celui de la formation de cordes et des différences de croissance ; c'est le NR-SC-DG (283), permettant de différencier les Mycobactéries tuberculeuses des Mycobactéries atypiques.

— *Mécanisme de la réaction* : Desbordes, Fournier font la relation avec le système enzymatique des bactéries (70), mais Viallier et ses collaborateurs ont constaté que les bacilles stérilisés à 120°C pendant 30 minutes donnent une réaction au rouge neutre. La théorie d'Asselineau et Lederer (11) attribuant cette coloration à l'acide mycolique et à un polysaccharide azoté et phosphoré est la plus couramment adoptée maintenant.

b) *Test de Desbordes.*

— *Principe de la méthode* : Desbordes et ses collaborateurs ont mis au point une réaction semblable à celle de Dubos, dans son principe. Après avoir essayé différentes substances (rouge neutre, bleu de Nil, cristal violet, violet d'aniline), qui ont chacune une zone de virage à un certain pH, alcalin ou acide, ils ont porté leur choix sur le bleu de Nil. C'est, en effet, avec le rouge neutre, le meilleur indicateur coloré (71, 77, 78, 79).

— *Réactifs* :

Solution d'alcool méthylique à 50 % ;

Solution tampon à pH 10, 5-11 composée d'une solution de carbonate de sodium à saturation ;

Bleu de Nil en solution aqueuse à 100 ml pour 1.000.

— *Technique* : les lavages préliminaires sont identiques à ceux de Dubos. Le culot bactérien est émulsionné avec 2 cm³ d'eau distillée auxquels on ajoute 1-2 gouttes de la solution tampon et 5 gouttes de la solution de bleu de Nil. Le liquide prend une teinte lilas. La lecture se fait dans les 5 minutes qui suivent.

— *Lecture* (D 5).

liquide	culot	
Bleu lilas	bleu outremer	→ Mycobactéries virulentes.
Bleu lilas	bleu lilas sale	→ Mycobactéries atténuées.
Rose mauve	gris rose	→ Mycobactéries avirulentes.

— *Mécanisme* : il serait le même que celui de la réaction au rouge neutre.

Les facteurs de ces deux cyto-tests furent étudiés dans tous les détails, afin de ne pas considérer comme résultat négatif un résultat qui ne serait dû qu'à une erreur d'expérience, car :

— les bacilles morts ou vivants présentent la même intensité de réaction ;

— les milieux pauvres doivent être tenus à l'écart car ils sont souvent source de réactions négatives ;

— le pH agit sur la vitesse de fixation du colorant ; plus il est alcalin, plus la réaction est rapide. De même, plus le colorant est dilué, plus la fixation est rapide ;

— Desbordes étudia aussi l'influence du lavage par les solvants des lipides (78) ; l'alcool méthylique-éther devrait être préféré car il est le meilleur solvant des lipides périphériques des mycobactéries.

c) *Test de Wilson, Kalish et Fish.*

De nombreux systèmes diastasiques ont été déjà étudiés, mais un point très important, sur lequel nous devons insister, est la faible activité déshydrasique des Mycobactéries virulentes.

— *Principe* : Wilson et ses collaborateurs basent leurs recherches sur le fait que le pouvoir d'oxydo-réduction varie avec la virulence (327). Ce pouvoir d'oxydo-réduction est dû à la présence, en plus ou moins grande quantité, d'un système diastasique représenté essentiellement par une déshydrogénase. Toutes les mycobactéries secrèteraient cet enzyme, mais celui-ci serait beaucoup plus intensément et plus facilement libéré par les bacilles atypiques.

— *Réactifs* :

● Quatre colorants furent utilisés : phénol indophénol, sodium benzénone indophénol, sodium benzénone indo 3 chlorophénol et sodium 2-6-dibromobenzénone indophénol ;

● solution tampon $\text{pH} = 7$:

phosphate monosodique	5,95 g
phosphate disodique	7,098 g
eau distillée	100 cm ³

— *Technique* : on isole 5 mg d'une culture que l'on met en suspension dans 1 ml d'eau ; on ajoute 0,15 cm³ de la solution colorante (5 mg de benzénone-indophénol + 5 cm³ de la solution tampon). On mélange et on attend 15 minutes avant de faire la lecture.

— *Lecture* :

- liquide non décoloré, germe virulent = réaction positive
+++
- liquide légèrement décoloré, réaction douteuse ±
- liquide décoloré, germe avirulent = réaction négative

Parfois, ce test donne des réactions positives avec des souches avirulentes : elles auraient gardé « une mémoire physiologique de leur passé » (Hauduroy).

La réaction de Wilson permettrait donc de savoir si une bactérie, pour le moment avirulente ou atténuée, a été autrefois virulente.

d) *Test de Bloch.*

Aksianzen, en 1933, puis Roulet, Lydler et Zeller avaient constaté l'action différente des souches virulentes et avirulentes de Mycobactéries sur le bleu de méthylène. Ils observent incidemment que *M. smegmatis* décolore le bleu de méthylène plus vite que *M. tuberculosis* (327).

Bloch mit au point le procédé et rapporte que les bacilles atypiques réduisent le bleu de méthylène en 1 à 3 minutes, alors que les bacilles tuberculeux avirulents le font en 2 à 15 minutes (25).

L'interprétation de cette réaction est délicate ; il faut une anaérobiose stricte. Ce test n'a qu'une valeur comparative (227).

B) Pouvoir antigène

Laporte, en 1951, pouvait écrire : « les caractères antigéniques des mycobactéries, sans être dépourvus d'intérêt, ne présentent pas, en ce qui concerne la répartition des espèces, l'importance qu'ils ont pour d'autres germes ».

En effet, à cette époque, la constitution antigénique des mycobactéries était mal connue, mais depuis, de nombreux auteurs se sont attachés à son étude. Il faut dire que cette recherche ne peut, à elle seule, être suffisante pour identifier une mycobactérie et qu'elle doit être complétée par toutes les études que nous venons de mentionner.

L'agglutination des mycobactéries fut tentée avec plus ou moins de succès (Arloing, en 1898, Wilson, en 1925, avec des sérums adsorbés) et complétés par la déviation du complément (Tulloc, Cumming, Griffith, Furth, Kauffmann...). Ces travaux, réalisés avec des sérums obtenus par inoculation aux animaux de germes entiers, tués par la chaleur, avaient mis en évidence un antigène commun aux bacilles tuberculeux humains et bovins.

Par la suite, l'agglutination d'hématies tannées (Boyden) permit de démontrer la présence, dans les filtrats de cultures des bacilles tuberculeux humains, de quatre protéines dont deux ayant une spécificité sérologique nette.

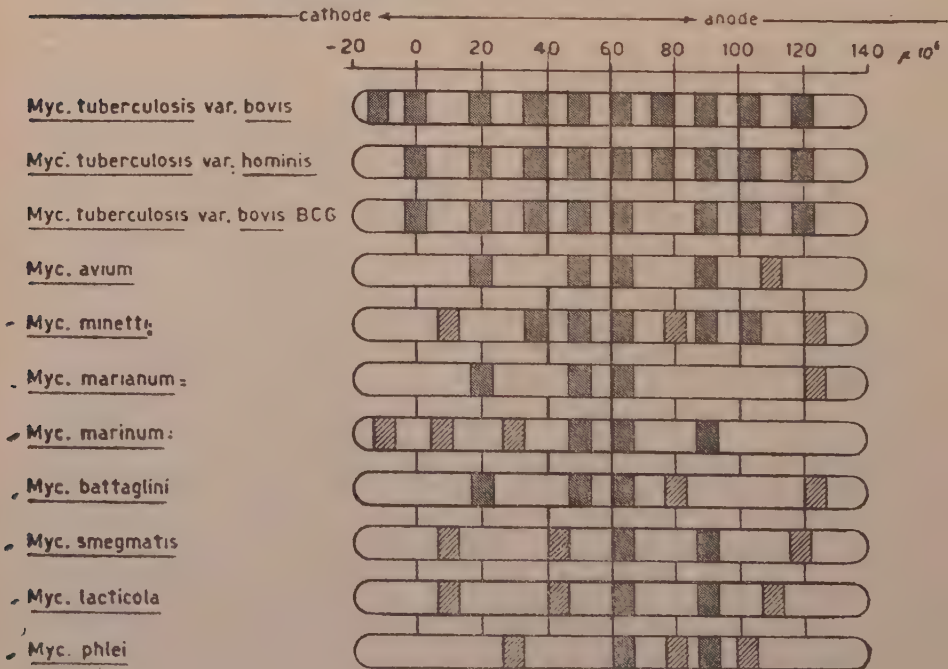
Puis l'électrophorèse mit en évidence des antigènes différenciables sérologiquement et ayant une mobilité électrophorétique différente.

Enfin, une autre technique fut adoptée, celle de la précipitation en gélose suivant la méthode d'Oudin-Ouchterlony, employée par Parlett et Youmans (1956-1958) et par Lind (1958) avec, comme antigène, des filtrats de culture (226). Elle permit l'étude des relations entre les précipitinogènes de *M. tuberculosis*, *M. phlei*, *M. smegmatis* et *avium*. Les « systèmes de référence » précipitinogènes-précipitines homologues ont indiqué qu'il existe 15 systèmes de précipitation pour *M. tuberculosis*, 7 pour *M. phlei* et *M. smegmatis*, et 5 pour *M. avium* (184, 185).

Grâce à cette technique, on put acquérir une meilleure connaissance des différents antigènes des mycobactéries, mais

Penso et Castelnuovo furent les premiers à introduire une enquête immunologique complète de ces germes, grâce à l'immunoélectrophorèse de Grabar et Williams, la technique de ces derniers consistant à pratiquer la précipitation spécifique en gélose sur des antigènes soumis auparavant à l'électrophorèse. Les anticorps présents dans le sérum et les constituants protéiques de la suspension antigénique diffusent dans le gel ; lorsqu'ils se trouvent en proportion convenable d'équivalence, ils forment un complexe antigènes-anticorps, qui se présente sous forme d'arcs de précipitation bien visibles. Chaque antigène présent dans la suspension réagit avec son anticorps homologue. Cette méthode immuno-électrophorétique a l'avantage de mettre en évidence les nombreux antigènes présents dans une bactérie. Cependant, ce procédé demande de nombreuses précautions, surtout en ce qui concerne la préparation des suspensions antigéniques, afin de ne pas altérer chimiquement leur composition (229).

MOBILITÉ ÉLECTROPHORÉTIQUE DES ANTIGÈNES



Dans le domaine des mycobactéries, on peut voir, grâce à cette méthode, que chaque souche possède un grand nombre d'antigènes spécifiques. Penso a résumé dans un schéma (tableau n°) la mobilité électrophorétique des antigènes des principales mycobactéries.

On voit ainsi que le nombre d'antigènes et leur mobilité électrophorétique sont constants pour chaque espèce et que toutes les espèces ont au moins un antigène commun.

Desbordes, étudiant la structure périphérique des mycobactéries après délipidation, par diffraction des rayons X, a confirmé l'existence de cet antigène commun à toutes les mycobactéries, qu'elles soient virulentes ou non.

Griffith, par la technique des sérums adsorbés, et Lind au moyen de la précipitation en gélose, avaient déjà fait la même observation.

En conclusion, nous retiendrons que :

- toutes les espèces ont au moins un antigène commun ;
- le nombre des antigènes et leur mobilité électrophorétique sont constants pour chaque espèce ;
- chaque souche a toute une série d'antigènes spécifiques.

C) Pouvoir immunigène

L'étude immunologique des bactéries atypiques est peu utilisée. Les connaissances actuelles sont pauvres. Nous retiendrons seulement le fait suivant : lorsque des cobayes sont inoculés par voie sous-cutanée avec des mycobactéries atypiques et, 21 jours plus tard, avec des bacilles tuberculeux virulents par voie sous-cutanée ou intradermique, aucun des cobayes réinoculés n'a présenté, au point de réinoculation, de phénomène de Koch, c'est-à-dire aucune réaction allergique tuberculinique. Il y a seulement apparition de lésions de tuberculose expérimentale, comme chez les témoins employés lors de la deuxième inoculation. L'injection préalable de l'antigène-mycobactérie atypique n'a donc provoqué chez l'animal aucune prémunition (Viallier).

D'après Youmans (334), seules les mycobactéries du groupe III auraient un degré d'immunité certain.

Toutefois, *M. microti* (Bacille du Campagnol de Wells) a été proposé pour constituer un virus vaccin persistant prémunisant paraspécifique vis-à-vis de la tuberculose humaine, donc du type du BCG.

D) Pouvoir allergène

La réaction allergique cutanée est employée pour le diagnostic de la tuberculose, à la fois en médecine humaine et en médecine vétérinaire. Aucune tuberculine n'est complètement spécifique, cependant il est maintenant bien connu que différentes mycobactéries peuvent être la cause d'une sensibilisation aux tuberculines PPD (purified protein derivatives) chez les Mammifères. En médecine humaine, Edwards, Edwards et Palmer, en 1955, aux U.S.A. (87), constatèrent également que des tests intradermiques comparatifs, avec la tuberculine humaine standard internationale et avec les PPD préparées à partir de souches variées d'organismes acido-résistants, donnaient tous des résultats positifs. Ils purent mettre en évidence une infection due à un ou plusieurs organismes se rapprochant plus, du point de vue antigénique, du bacille tuberculeux aviaire et de quelques bacilles atypiques, que du bacille tuberculeux humain. Lesslie (178), à Weybridge, étudia le problème des mycobactéries atypiques chez les Bovins et, parmi les souches atypiques isolées, il trouva surtout *M. fortuitum* et *M. phlei*, ainsi que d'autres souches chromogènes à croissance plus lente qui, antigéniquement et culturellement, se rapprochaient plus du type tuberculeux aviaire.

Crawford (64) et Hasting (130), en 1936, parlaient déjà de la sensibilisation par des organismes saprophytes et envisageaient les erreurs possibles du fait de leur grand nombre dans le sol (108).

Canham (52) arriva à sensibiliser des veaux à la tuberculine bovine, en leur injectant *M. butyricum* et *M. phlei*, mais seulement sous forme d'émulsions huileuses. Cependant, *M. phlei* en suspension dans l'huile d'olive ou de paraffine ne sensibilise que très faiblement et pour une courte période (152).

Green (122) montra que de très hautes doses de tuberculine humaine étaient nécessaires pour cacher la réaction de PPD phlei sur des cobayes sensibilisés avec *M. phlei* tué, et un adjuvant huileux.

La démonstration par Stuart et Harvey (269) tendant à prouver que *M. lacticola* peut devenir pathogène une fois mélangé à de l'huile est intéressante. Naturellement ou expérimentalement, les animaux infectés réagissent à la PPD lacticola, mais non à la tuberculine humano-bovine.

Tous ces faits conduisent à penser que les mycobactéries ne sont pas une cause unique des réactions non spécifiques à la tuberculine, mais il est important de rappeler que la sensibilité peut être produite expérimentalement par l'emploi d'adjuvants huileux. L'adjuvant le mieux étudié, la paraffine liquide, agit apparemment en amenant les mycobactéries (244) ou leurs produits (56) au niveau des cellules responsables de la production d'anticorps réagissants. Si les matériaux naturels peuvent produire de l'huile dans des émulsions aqueuses de mycobactéries, une sensibilité à la tuberculine type doit apparaître.

Les travaux de Raffel, Choucroun, suggèrent qu'une fraction des cirres des mycobactéries est importante pour le développement de la sensibilité à la tuberculine type.

Toutes ces observations n'ont qu'un intérêt spéculatif dans leur application aux réactions non-spécifiques du bétail. De nombreux travaux expérimentaux sur les co-allergènes des mycobactéries atypiques le prouvent.

Savoy (253) inocule à des veaux, dans la veine jugulaire, des cultures de type humain, aviaire ou de bacilles atypiques, et pratique, 12 jours à 11 mois après l'injection, des tests tuberculiniques au-devant de l'épaule. Les animaux infectés avec les mycobactéries atypiques réagissent également à la tuberculine aviaire et humano-bovine, avec une réaction cutanée de 0,6 à 1,4 mm seulement et ne présentent aucune lésion à l'épaule.

Tolhurst (288) montre, sur des veaux infectés par *M. ulcerans*, que la sensibilisation a lieu aussi bien à la tuberculine des mammifères qu'à l'ulcéramine.

Freerksen (105) constate, avec des inoculations de Mycobactéries atypiques, des réactions positives ou douteuses avec la tuberculine humano-bovine. Cependant, l'ingestion, par des

veaux, de *M. phlei*, *fortuitum*, *smegmatis* mélangés à du lait (106), produit une réaction positive temporaire à la tuberculine humano-bovine. Dans les tests comparatifs simultanés, la réaction avec les souches homologues est plus forte et persiste plus longtemps.

Beck (19), Magnusson (195), sur le Cobaye, montrent que les sensitines des mycobactéries atypiques ont des spécificités différant à la fois entre elles et avec celles des tuberculines humaine, bovine et aviaire.

Magnusson, Engbaeck et ses Collaborateurs, qui ont étudié comparativement la tuberculine et un extrait de *M. kansasii*, ont constaté toutefois que les réactions homologues ne sont pas toujours plus intenses que les réactions hétérologues et que, par conséquent, il n'est pas possible de conclure que, si un malade réagit plus fortement à un extrait bacillaire, ce malade est avec certitude infecté par la même mycobactérie.

En clinique humaine, l'allergie croisée entre tuberculine et para-tuberculine a fait l'objet de recherches approfondies par Devulder à l'Institut Pasteur de Lille. L'usage comparatif d'extraits obtenus à partir de diverses mycobactéries atypiques présente un intérêt certain pour la détection des infections humaines correspondantes. Mais il existe, pour chaque type, une dose critique qu'il n'y a pas intérêt à dépasser pour l'étude des réactions spécifiques. Lorsqu'on la dépasse, on risque de mettre en évidence des réactions non spécifiques.

On peut retenir que les souches du groupe photochromogène ont leur propre sensibilité respective, la souche humaine se rapproche davantage de ce groupe que du groupe non chromogène dans sa sensibilité tuberculinique. D'un autre côté, la sensibilité tuberculinique du groupe non chromogène est presque identique à celle des souches aviaires. A partir de ces faits, le groupe non chromogène peut être rapproché des souches aviaires.

E) Bactériophagosensibilité

La sensibilité à divers *mycophages* a permis d'envisager une *lysotypie* (*phage typing*) de diverses espèces de Mycobactéries.

Dans le domaine des Mycobactéries, l'introduction de phages est une découverte relativement récente, puisqu'il a fallu attendre 1947, époque à laquelle Gardner et Weiser (110) trouvent un phage actif sur *M. smegmatis*. L'étude des phages est pratiquée depuis que l'école italienne s'est attachée à inventorier et à classer ce domaine des Mycobactéries.

1. Développement d'un mycobactériophage chez sa cellule-hôte

La « démolition phagique » des bactéries est un phénomène brutal et rapide. Lors du contact entre le phage et la bactérie, il y a une première phase de latence où l'on ne voit rien, puis, quelques minutes après, les phages réapparaissent nombreux et font éclater les enveloppes bactériennes, comme des grenades trop mûres leur coque. Cependant, chez les Mycobactéries, la destruction phagique demande un temps relativement long, 2 à 3 heures le plus souvent ; et on note surtout, dès la pénétration du phage dans la bactérie, la transparence aux électrons de celle-ci. On peut donc suivre le développement du phage au microscopie électronique sans léser les structures. C'est ce qui a permis à Penso, en 1953, d'établir le cycle du phage en suivant celui-ci dans la bactérie-hôte.

2. Obtention des bactériophages

C'est avec les phages que l'on peut mettre en évidence les antigènes superficiels des mycobactéries. Le problème est d'obtenir un assez grand nombre de phages, de les individualiser et de les faire agir successivement sur toutes les souches de Mycobactéries.

Les auteurs ont pensé que, pour trouver des phages, il fallait les chercher en des endroits où les mycobactéries se trouvaient elles-mêmes en grand nombre. Ils prennent de la terre avoisinant les fumiers, versée et agitée dans une quantité équivalente d'eau, puis ils filtrent sur gaze, papier mou, papier dur, et enfin dans une bougie Chamberland L₃. Du liquide ainsi obtenu on dépose quelques gouttes au centre d'une culture. On laisse la destruction phagique atteindre son maximum, puis on recueille la couche superficielle de gélose. On la broie avec

du bouillon et on filtre le liquide sur Seitz. On a ainsi isolé un phage. Lors du prélèvement de la terre, il ne faut jamais stériliser au préalable (143).

Hauduroy, Rosset (131), Szabo et Vandra (271), Vandra (295), Eustatziou (94), Segawa (259) et Penso et ses Collaborateurs ont isolé de nombreux phages et les ont testés envers les mycobactéries. Les phages obtenus, il faut les individualiser par des méthodes sérologiques. Par les méthodes de déviation croisée, on arrive à isoler des sous-types antigéniquement dissemblables, donc des types de phages.

3. Lysotypie dans l'identification des Mycobactéries :

On sait que les phages se fixent sur un constituant déterminé de la bactérie sensible auquel on a donné le nom de récepteur. Or ces récepteurs sont liés à la présence, dans la bactérie, d'un antigène somatique superficiel, comme l'a montré Burnet, en 1930. Ces phages peuvent ainsi servir à révéler les antigènes superficiels.

Grâce à la lysotypie croisée, on a pu mettre en évidence un antigène superficiel commun à de nombreuses espèces, des antigènes superficiels communs à deux ou trois espèces, enfin des antigènes superficiels strictement spécifiques. *M. phlei*, par exemple, a un antigène superficiel nettement individuel et spécifique ; les Mycobactéries tuberculeuses ont un antigène superficiel commun avec les Mycobactéries à croissance rapide, ces espèces se différenciant entre elles par un troisième ou quatrième antigène ou tous les deux ensemble. Les mycobactéries aviaires ne possèdent aucun antigène qui puisse servir de récepteurs aux phages découverts jusqu'à ce jour.

Les antigènes superficiels qu'on peut mettre en évidence par la lysotypie phagique permettent, s'il y a correspondance avec les résultats d'autres études, l'identification spécifique de la mycobactérie. Le phagus *fromani*, par exemple, met en évidence un antigène commun à de nombreuses espèces et absent chez *M. marianum* et *M. battaglini*, exactement l'antigène de mobilité 90. Le phage typing et l'immunoélectrophorèse coïncident parfaitement et permettent de différencier les deux espèces.

L'étude des antigènes, quelle que soit la méthode employée, peut donc contribuer à l'identification des espèces. Mais cette étude ne concerne que les antigènes « naturels ». Il est, en effet, possible d'extraire chimiquement différentes substances douées de pouvoir antigénique ou hapténique (protéines, polysaccharides, lipides), qui ont par ailleurs été très étudiés mais qui sont souvent la conséquence de réactions chimiques complexes, les rendant incapables d'être utilisés dans un but de détermination de l'espèce.

CHAPITRE V

PLACE DANS LA SYSTEMATIQUE ET ESSAIS DE CLASSIFICATION

Successivement seront étudiés : la place des Mycobactéries atypiques dans la systématique bactérienne générale, les essais de classification de ces germes, et enfin la proposition d'une clé dicotomique rapide et pratique de détermination.

A) Place dans la systématique bactérienne générale

La systématique bactérienne, dans les cadres fixés par A.-R. Prévot, suit, pour les mycobactéries, les étapes suivantes :

- Embranchement des *Schizomycètes*,
- Sous-embranchement des *Mycobacteria*,
- Classe des Actinomycétales,
- Ordre des Mycobactériales,
- Famille des Mycobacteriaceæ.

On ne distingue qu'un seul genre *Mycobacterium*, mais ce genre comprend des espèces multiples qui se révèlent difficiles à classer.

B) Essai de classification

Thomson (1932) et Gordon (1937), Gordon et Hagan, les premiers, essayèrent de grouper les mycobactéries atypiques selon leur rythme de multiplication, la température d'incubation et les réactions chimiques.

Penson, en 1950, les classa selon leur température de croissance. « Il existe un groupe de mycobactéries capables de bien se développer à 50°C ; il en existe un autre incapable de se développer à 50°C, mais capable de pousser à 47°C... ; il existe enfin un dernier groupe incapable de pousser à 37°C, mais capable de se développer à la température du milieu antérieur ».

Gordon et Smith, en 1953-1955, classèrent la plupart des souches qu'ils avaient étudiées en trois variétés : *phlei*, *smegmatis*, et *fortuitum*, en utilisant leur développement à certaines températures, la fermentation des hydrates de carbone, l'hydrolyse et l'amidon, etc...

Hauduroy propose une classification sommaire des bacilles autres que les bacilles tuberculeux, en envisageant le pouvoir pathogène et leur saprophytisme.

Runyon, en 1955, n'admet plus la différenciation saprophytes-atypiques et propose quatre groupes (249) :

— Groupe I : bacilles photochromogènes poussant assez lentement (8 à 20 jours), produisant un pigment jaune orange après une courte exposition à la lumière, responsable d'infections humaines et pathogène en général pour les animaux.

— Groupe II : bacilles scotochromogènes poussant assez lentement (8 à 20 jours) et dont les colonies sont toujours de couleur jaune orange à l'obscurité comme à la lumière. Ce sont des contaminants habituels, saprophytes des végétaux, à l'origine de suppuration prolongée chez l'enfant.

— Groupe III : bacilles non photochromogènes, poussant assez lentement, non ou très peu pigmentés. A ces souches, on donne souvent le nom de « Battey » pour rappeler leur isolement à l'Hôpital Battey en Géorgie. Ils rappellent le bacille aviaire ; ils sont parfois isolés chez l'Homme.

— Groupe IV : bacilles à croissance rapide ; ces bacilles habituellement peu ou non pigmentés, poussent en 2 à 3 jours sur Loewenstein-Jensen.

Gernez-Rieux (113) apporte des modifications à la classification de Runyon. Pour lui, on pourrait réunir tous les photochromogènes en une seule espèce : *M. kansaii*. De même, la

plupart des mycobactéries du groupe II, scotochromogènes, sont assimilables à une espèce de bacille décrite par Galli-Valerio en 1912-1927 : *M. aquæ*. L'espèce ainsi définie n'est pas homogène : d'après les études enzymatiques récentes (Bönicke, 1959 et 1962), il en existerait au moins trois types. Dans le groupe III, les souches sont analogues à une variété, non pathogène pour la poule, du bacille aviaire au pouvoir infectant chez l'Homme. Il est logique de classer ces mycobactéries avec l'espèce *M. avium* dont les propriétés enzymatiques sont identiques.

D'autres auteurs ont essayé de classer certains groupes : L. Meissner (206), Youmans (333), Jensen (151), Juhlin ; mais aucune classification proposée n'a reçu un accueil unanime.

Les acquisitions bactériologiques récentes conduisent au démembrement artificiel des « Mycobactéries atypiques » et au classement des souches correspondantes en espèces bien déterminées.

En l'absence d'une classification admise par tous, nous retiendrons celle de Joubert et Oudar (153), dérivée à la fois de la systématique bactérienne de Prévot de 1961 et de la séparation en quatre types de mycobactéries atypiques due à Runyon en 1955 :

1. Mycobactéries pathogènes pour les mammifères et les oiseaux

- *Mycobacterium tuberculosis* = *M. tuberculosis*, var. *hominis* (Zopf, 1883 ; Lehmann et Neumann, 1896).
- *Mycobacterium bovis* = *M. tuberculosis*, var. *bovis* (Lehmann et Neumann, 1907 ; Bergey, 1934).
- *Mycobacterium paratuberculosis* = Bacille de Johne (Bergey, 1923).
- *Mycobacterium avium* = *M. tuberculosis*, var. *avium* (Sternberg, 1893 ; Chester, 1901).
- *Mycobacterium lepræ* (Hansen, 1874).
- *Mycobacterium microti* (Wells, 1937 ; Leed, 1957).
- *Mycobacterium lepræ murinum* (Hansen, 1874).

2. Mycobactéries pathogènes pour les animaux poïkilothermes

A) POISSONS	{	<i>Mycobacterium piscium</i> (Dubard, 1897-Bergey, 1923).
		<i>Mycobacterium anabanti</i> (Besse, 1949).
		<i>Mycobacterium platypoecilus</i> (Baker et Hagen, 1942).
B) TORTUE		<i>Mycobacterium chelonae</i> (Holland, 1920 Hagen, 1923).
C) SERPENTS, LÉZARDS, GRENOUILLES, POISSONS		<i>Mycobacterium thamnopheos</i> (Aronson, 1929).
D) GRENOUILLE		<i>Mycobacterium ranæ</i> (Kuster, 1905 - Bergey, 1923).

3. Mycobactéries atypiques

A) FOTEMENT PIGMENTÉES	{	à croissance lente (+ de 8 jours)	Scotochromogènes : Type II de Runyon. <i>M. aquæ</i> = <i>M. scrofulaceum</i> .
		à croissance semi-rapide (de 2 à 8 jours)	Photochromogènes : Type I de Runyon. <i>M. kansasii</i> = <i>M. luciflavum</i> (Hauduroy, 1955).
		à croissance rapide (— de 2 jours)	Photochromogènes : <i>M. marinum</i> = <i>M. balnei</i> .
			Photochromogènes : <i>M. smegatis</i> (Trevisan, 1869. Lehmann et Neumann, 1899). <i>M. phlei</i> = <i>M. lacticola</i> (Lehmann et Neumann, 1899).

B) FAIBLEMENT OU NON PIG- TÉES.	Type III de Runyon.
non photochromogènes à croissance lente	<i>M. ulcerans</i> (Mc Callum, 1950) et « types Battey ». <i>M. avium</i> , var. <i>cutis</i> et var. <i>suis</i> .
C) NON PIGMENTÉES.	Type IV de Runyon.
à croissance semi-rapide (de 2 à 8 jours)	<i>M. fortuitum</i> = <i>M. mi- netti</i> (de Penso, 1952 ; Minett, 1932 ; Cruz, 1938).

Une quarantaine de tests sont nécessaires pour conduire à cette classification. Les principaux de ces tests sont résumés dans les tableaux n° 1 et n° 2.

Il faut tout d'abord différencier les mycobactéries à étudier des mycobactéries essentiellement pathogènes. Ceci est possible, comme le montre le tableau n° , à la faveur de :

— *La culture* : seules les mycobactéries atypiques sont productrices de pigments. De plus, leur densité culturale varie en sens inverse de *M. tuberculosis* et *M. bovis* : abondante à 20°, leur pousse devient faible à 37° ; on peut les rapprocher en ceci de *M. avium*, mais la distinction sera faite à 45° : à cette température, seule *M. avium* est capable de cultiver.

— *La biochimie* : les mycobactéries atypiques, à 70°, possèdent une catalyse, alors que *M. tuberculosis* et *M. bovis* n'en produisent pas. Au contraire, la peroxydase présente chez ces deux dernières est absente des mycobactéries atypiques. La nicotinamide enfin permet la différenciation avec *M. avium*, qui présentait, pour la catalase et la peroxydase, les mêmes réactions que les mycobactéries atypiques.

— *La sensibilité aux mycostatiques* : nulle chez les mycobactéries atypiques, elle existe chez les autres groupes, quoique assez faible en ce qui concerne *M. avium*.

— *La virulence* : Saprophytes ou parasites facultatifs, les mycobactéries atypiques ne présentent un pouvoir pathogène à l'expérimentation, que très rarement et de faible intensité. Ce pouvoir pathogène n'est d'ailleurs constaté que chez le cobaye ou la souris.

Au sein des mycobactéries atypiques, l'étude conjuguée de la rapidité d'apparition des cultures, du type des colonies, la chromogénèse, la sensibilité aux antibiotiques, ainsi que la virulence expérimentée sur souris, permettront une différenciation spécifique de chaque espèce.

Les résultats de ces différents tests sont consignés dans les tableaux n° 2 et 1.

La lecture du tableau n° 1 présente le genre *Mycobacterium* comme constitué de bacilles acido-alcoolo-résistants, indifférenciables par leur morphologie et leurs affinités tinctoriales et qui présentent :

1. *un caractère commun* : celui de créer chez l'Homme et les animaux à sang chaud un état d'allergie spécifique et croisée ;
2. *un ensemble de caractères différentiels homogènes*, soit :
 - le *parasitisme* facultatif (F) ou obligatoire (O) ;
 - la *virulence* naturelle et expérimentale ;
 - la *pigmentation* des colonies et le délai d'apparition des cultures à différentes températures ;
 - les *propriétés biochimiques*, dont la sensibilité aux mycostatiques, ...

Les Mycobactéries atypiques sont des saprophytes ou des parasites facultatifs seulement capables, en général, d'entraîner des lésions externes cutanées, alors que les bacilles tuberculeux et le bacille de Johnne sont toujours des parasites obligatoires. On ne saurait alors s'étonner de constater que la température optimale de culture de ces bactéries soit de 20° à 30°, alors que les parasites stricts se sont accoutumés à une température culturale de 37°.

En outre, l'antibiorésistance systématique aux mycostatiques des Mycobactéries atypiques confirme leur saprophytisme par rapport aux bacilles tuberculeux toujours sensibles, sauf acquisition d'une résistance médicamenteuse. Le bacille de Johnne, et surtout la variété aviaire du bacille tuberculeux, marque un terme de passage, qui vient confirmer la parenté des Mycobactéries atypiques en général, et en particulier celles du type Battey avec le bacille aviaire.

Caractères	Morphologie et coloration	CULTURES					BIOCHIMIE				BIOLOGIE				
		Pigments	Densité culturale et délais d'apparition (en jours)				Catalase à 70°	Peroxidase	Nicotinamide	Sensibilité aux mycostatiques	Parasitisme et virulence naturelle	Virulence expérimentale			
			20°	30°	37°	45°						Cob.	Lap.	Sou.	Pou.
Aucune différenciation certaine															
<i>M. tuberculosis</i> (hominis)	0	0	+ 16	+ 12	0	—	+	+	+	+	OBL Homme (+ animaux)	++	+	++	0
<i>M. tuberculosis</i> bovis	0	0	+ 40	+ 30	0	—	+	—	+	+	OBL Bovins (+ homme et animaux)	++	++	++	0
<i>M. paratuberculosis</i> (John)	0	0	0	0	0	+	—	—	±	—	OBL Bovins exclusivement	0	0	0	0
<i>M. tuberculosis</i> avium	0	+ 12	+ 12	+ 10	+ 10	±	—	—	±	—	OBL Oiseaux (+ animaux)	±	+	±	++
Mycobactéries atypiques	++ +	++ +	+	+	±	+	—	+	0	+	FAC ou SAP Homme et animaux	0 (±)	0	0 (±)	0
2 à 6															
sauf exceptions															

La lecture du tableau n° 1 précise les caractères différentiels des Mycobactéries atypiques entre elles.

Récemment, Gernez-Rieux (113) et ses collaborateurs, après les travaux de Runyon, ont excellemment décrit les différents tests qui permettent d'identifier les Mycobactéries atypiques et de les classer, tout au moins provisoirement, en plusieurs groupes formés d'espèces aujourd'hui assez bien déterminées, saprophytes mais éventuellement pathogènes pour l'Homme et les animaux.

Cette identification se fonde sur une quarantaine de tests réductibles de moitié pour les déterminations courantes :

1. *morphologiques* : aspect, taille, degré de l'acido-alcoolorésistance ;

2. *cultureux* : possibilité et rapidité de croissance sur milieu de Loewenstein-Jensen à 20°, 30°, 37°, 45°, aspect eugonique ou dysgonique des colonies, pigmentation à la lumière ou à l'obscurité, aspect sur milieu de Dubos en Twen 80, et de Youmans, présence de cordes en milieu de Youmans ;

3. *biochimiques* : catalase à 20° et 70°, peroxydase à 20° et 70°, nicotinamide, amidases : urée, acétamide, benzamide, pyrazinamide (PZA), succinamide, réduction des nitrates ;

4. *antibiotiques* : sensibilité à l'hydrazide de l'acide isonicotinique (INH), à l'hydrazide de l'acide thiophène 2 carboxylique (5CH), à la PZA, à la streptomycine, le 1314, la kanamycine, les sulfones ;

5. *pouvoir pathogène expérimental* ;

6. *allergiques* : qualitatives,, quantitatives et comparées vis-à-vis de la tuberculine humano-bovine d'une part, aviaire d'autre part, et d'une « sensitine » préparée à partir des souches sous test ;

7. *lysotypiques* : grâce à la classification mycophagique ;

8. *sérologiques, immunologiques et immunochimiques*, non couramment utilisées en raison de leurs imperfections et de leurs difficultés.

Ces tests, cependant, dans l'état actuel de nos connaissances, ne peuvent tous servir à l'identification et à la classification des Mycobactéries. On peut en retenir (tableau n° 2) :

— le *saprophytisme* ou le parasitisme facultatif ou obligatoire ;

— la *virulence* naturelle et expérimentale chez la souris ;

— les *délais d'apparition* à différentes températures des cultures : eugonique (E) ou dysgonique (D) ;

— l'*aspect* rugueux (R) ou lisse (S) des colonies et la *pigmentation* à la lumière (photochromogène) ou à l'obscurité (scotochromogène) ;

— la *sensibilité* aux mycostatiques (S = streptomycine, V = viomycine, K = kanamycine, C = cyclosérine, T = TBL).

Ces tests simplifiés autorisent la classification de ces germes.

C) Proposition d'une clé de détermination

Pour faciliter la collection des résultats de ces tests et guider le bactériologiste dans l'identification des mycobactéries, une clé de détermination dichotomique a été proposée.

Caractères Espèces de Mycobac- térium	Morphologie et Coloration		CULTURES				BIOCHIMIE							BIOLOGIE			Groupes de Runyon				
	Délais (en jours)		Colonies	Pigments		Sensibilité aux Mycostatiques							expérimentale	(souris) Parasitisme	Virulence naturelle						
				Photo	Chro- mo																
																20°		30°	37°	45°	Vio.
M. ulcerans	+ 30		+ 21	0	0	R D	0	0	+	+	+	+	+	+	0	0	0	FAC	H peau	+	I
M. kansasii	+ 30		+ 12	+ 10	0	S ou R E cordes	+	0	+	+	+	+	+	+	0	0	0	OBL	H peau poumon	+	II
M. aquae ..	+ 6 à 30		+ 4 à 40	±	0	S ou R E ou D cordes	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0	0	FAC	H et A peau poumon	+	III
M. suis ...	±		+ 12	+ 10	+ 10	S E	0	0	+	+	+	+	±	±	0	0	0	FAC	H et A peau poumon	+	IV
M. fortuitum	+ 4		+ 2	+ 2	0	R E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	FAC	H peau	+	
M. balnei .	+ 4		+ 3	±	0	S E cordes	+	0	+	+	+	+	0	0	0	0	0	FAC	H peau	+	
M. smegmatis	+ 4		+ 2	+ 2	+ 3	S E	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	SAP	0	0	

CROISSANCE LENTE (plus de 6 jours)		
Non chromogènes	Niacine et nitrates + Tuberculose du cobaye	<i>M. tuberculosis (hominis)</i>
	Niacine et nitrates — { Tuberculose du lapin + poule — Tuberculose de la poule + lapin + poule — lapin — Paratuberculisation des bovins Paratuberculisation des rongeurs	<i>M. tuberculosis (bovis)</i> <i>M. avium</i> <i>M. suis</i> <i>M. paratuberculosis</i> <i>M. microti</i>
chromogènes	Photochromogènes. Pigmentation jaune tardive. Non pigmenté à l'obscurité totale.	<i>M. kansasii</i>
	Scotochromogènes. Non pathogène sauf souris ±	<i>M. aquae</i>
CROISSANCE RAPIDE (2 à 3 jours)		
Non chromogènes	Photochromogènes	<i>M. marinum</i> (<i>M. balnei</i>)
	Scotochromogènes { culture à 52° thermorésistant (4 h. à 60°) orange Non thermorésistant rouge ou brun	<i>M. phlei</i> <i>M. pellegri</i>
chromogènes	Culture à 45°	<i>M. smegmatis</i>
	Pas de culture à 45° nicotinamide + nicotinamide —	<i>M. fortuitum</i> <i>M. thamnophaeos</i>

DEUXIEME PARTIE

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DE TROIS SOUCHES
DE MYCOBACTERIUMS AQUAE
ISOLEES DANS LA THELITE TUBERCULOIDE
DE LA VACHE LAITIERE**

Dans la grande majorité des prélèvements effectués sur des pièces d'exérèse provenant de vaches laitières atteintes de thélite nodulaire tuberculoïde, il est relativement aisé de mettre en évidence des bacilles acido-alcool-résistants, soit par coloration sur frottis ou coupes histologiques.

Malheureusement, ces germes présentent irrégulièrement des exigences métaboliques telles que leur culture à l'isolement et même leur subculture sur les milieux habituellement utilisés dans l'étude des mycobactéries se soldent le plus souvent par un échec.

Aussi parvient-on à la conception d'une affection cliniquement et anatomiquement univoque, mais probablement déterminée par divers membres plus ou moins proches et appartenant à la famille des mycobactéries atypiques.

Trois souches de mycobactéries atypiques ont été spécialement étudiées dans leurs caractères cultureux, biochimiques, pathogènes et allergènes en accord avec la classification moderne et les tests différentiels de ce groupe de germes. Certes cette étude est incomplète, mais suffisante pour affirmer qu'il s'agit de *Mycobacterium aquae* (Golli Valerio, 1912) dont la détermination est devenue une certitude...

I. — Caractères cultureux

1° Prélèvements

Les nodules du trayon ont été étudiés aux divers stades de leur évolution. Toutes les précautions étaient prises pour éviter une éventuelle contamination par des germes saprophytes (désinfection de la surface du nodule, prélèvement à l'intérieur de la lésion). Une fraction des prélèvements était ensemencée, partie après homogénéisation suivant les techniques classiques d'isolement du bacille de Koch, à la soude d'une part, au biocidan d'autre part ; partie sans homogénéisation, soumise à la recherche bactérioscopique qui ne fournit

aucune information différentielle digne d'être notée. En effet, les germes apparaissent sous la forme de bacilles mesurant 4 à 5 μ de long sur 0,45 à 0,50 μ de large. Ils sont cyanophiles et acido-alcool-résistants, souvent très granuleux. La souche 6040 I.P. présente des formes en haltères. Ces bacilles donnent des suspensions homogènes.

2° Milieux de culture

Quatre milieux ont été systématiquement utilisés : milieux de Loewenstein, Loewenstein-Jensen, Dubos et Youmans, à diverses températures : 20°, 30° et 37°.

3° Caractères cultureux :

1° MILIEU DE LOEWENSTEIN : les colonies sont lisses (forme S), pigmentées à l'obscurité en jaune orangé par photo-induction ; il s'agit donc de germes *scotochromogènes*, c'est-à-dire se pigmentant à l'obscurité.

2° MILIEU DE JENSEN : les colonies sont assez petites, lisses (forme S), jaune orangé.

La souche 6040 I.P., eugonique, cultive beaucoup plus rapidement que les deux autres souches dysgoniques. Avec un inoculum de 10^{-4} mg, les vitesses de croissance ont été les suivantes :

Souches	Températures	Jours	Type de colonies
6040 I.P.	20°	6	S. eugonique
	30°	2	
	37°	2	
6138 I.P.	20°	35	S. dysgonique
	30°	35	
	37°	0 culture au 40° jour	
6140 I.P.	20°	30	S. dysgonique
	30°	12	
	37°	21	

3° MILIEU DE DUBOS : les cultures sont homogènes et abondantes. Les bacilles sont généralement épais avec de nombreuses formes roses à granulations foncées et s'assemblent en petits groupes ou en streptobacilles. Le culot microbien est pigmenté.

4° MILIEU DE YOUMANS : la culture est hétérogène et granuleuse pour les souches 6138 I.P. et 6140 I.P. (dysgoniques), du type bacille de Koch, avec des germes cocciformes, acido-alcool-résistants, homogènes en gros amas bourgeonnants. En revanche, la culture de la souche 6040 I.P. (eugonique) est homogène. Dès ce stade apparaît donc une hétérogénéité entre les souches de *M. aquae* isolées, et cette hétérogénéité serait vraisemblablement beaucoup plus nette encore si des confrontations avaient pu être établies vis-à-vis des souches exigeantes non cultivées. Les « cordes » sont absentes ou très rares.

II. — Caractères biochimiques

Les germes des différentes souches conservent leur catalase après chauffage à 70° ; ils ne possèdent pas de peroxydase, réduisent les nitrates.

antibiotiques Souches	INH	PAS	Strepto- mycine	Cyclo- sérine	Viomycine *	B 14 TH	Kana- mycine	PZA
6040 I.P.	+	0	+	+	+	+	0	0
6138 I.P.	0	0	+	+	+	non titrable	+	0
6140 I.P.	0	0	±	+	0	+	0	0

La sensibilité aux antibiotiques varie suivant les souches (tableau ci-dessus). Toutes sont sensibles à l'action de la cyclosérine, résistantes au PAS et au PZA.

L'antibiorésistance de la souche 6040 I.P. est semblable à celle du bacille tuberculeux humain.

En conclusion, les caractères *culturels* et *biochimiques* permettent d'identifier ces trois souches et de leur assigner une place dans la classification des mycobactéries.

Les trois souches semblent distinctes par certaines de leurs propriétés (vitesse de croissance, sensibilité aux antibiotiques...), mais, par leur pigmentation à l'obscurité (scotochromogènes) et leurs propriétés biochimiques, *elles appartiennent au groupe II de Runyon et peuvent être identifiées comme Mycobacterium aquæ* (= *M. scrofulaceum* = *orange bacillus*). Les différences observées nous conduisent à les séparer en types différents, comme R. Bönicke l'avait déjà signalé (type 1, 2 et 3 de Bönicke).

La souche 6040 I.P., eugonique, se rapproche de *M. balnei* mais s'en éloigne par son caractère scotochromogène et son antibiogramme ; elle appartiendrait ainsi à un type différent des souches 6140 I.P. et 6138 I.P. (dysgonique), très voisines l'une de l'autre.

III. — Propriétés biologiques

Pouvoir pathogène expérimental

1. ANIMAUX DE LABORATOIRE.

— *Inoculation à la souris* : Quelques semaines après l'inoculation par voie intraveineuse à la dose de 0,01 mg, des lésions hépatiques et spléniques sont observées à l'autopsie des animaux, qui meurent spontanément après des délais très divers.

— *Inoculation au cobaye* : L'inoculation de 4 mg de culture par voie sous-cutanée a entraîné la mort d'un certain nombre de ces animaux en cachexie, deux mois environ après l'inoculation (15 cobayes sur 20 ont succombé). Les germes ont été réisolés d'abcès au point d'inoculation et des ganglions

mésentériques. En revanche, aucune lésion n'a été constatée sur les différents organes après autopsie des cadavres.

— *Inoculation au lapin et à la poule* : Toutes les inoculations, effectuées par des voies différentes (sous-cutanée, intradermique, intrapéritonéale, intramusculaire et intraveineuse) à des doses variables, sont restées sans résultat.

Le *pouvoir pathogène* est donc *nul ou très faible sur les animaux de laboratoire*, sauf pour la souris et le cobaye, relativement sensibles.

2. BOVINS.

La reproduction de la thélite nodulaire par inoculation intradermique de la souche 6040 I.P. dans le trayon a été tentée sur deux vaches laitières, dont l'une présentait une sécrétion lactée très diminuée (2 litres de lait par jour) et l'autre était une génisse en pleine lactation, nourrissant un veau.

Une première série d'inoculations est réalisée à partir d'une culture sur milieu de Loewenstein-Jensen, émulsionnée en eau salée isotonique, à raison de 4 mg de culture par ml. Les résultats ayant été négatifs, une deuxième série d'inoculations est effectuée en mélangeant les bacilles de culture à de l'eau salée isotonique, du lait et de l'huile de paraffine. Les inoculations sont réalisées en deux points différents de chaque trayon, suivant le schéma :

- trayon antér. gauche : témoin eau salée isotonique,
témoin huile de paraffine.
- trayon postér. gauche : lait + souche 6040 I.P.
- trayon antér. droit : eau salée isotonique + souche 6040 I.P.
- trayon postér. droit : huile de paraffine + souche 6040 I.P.

Animal n° 1 : 15 jours environ après l'inoculation, des nodules apparaissent sur le trayon postérieur droit, les autres restant indemnes. Les nodules sont bien délimités, circulaires, de 1 cm de diamètre, durs à la palpation. Au bout d'un mois se manifeste un point de fluctuation, avec formation d'un pus jaune orangé en petite quantité. L'abcès se cicatrise en deux

mois. Le germe a été réisolé à l'état pur du pus de l'abcès et l'étude histologique ne peut différencier ces lésions spontanées et expérimentales.

Animal n° 2 : des nodules apparaissent, de même, en une huitaine de jours, aux points d'inoculation correspondant au mélange : bacilles paratuberculeux + huile de paraffine, mais ces nodules, bien délimités, sont plus petits et disparaissent en quinze jours. Cet animal se trouve en pleine lactation et nourrit entièrement son veau, sans l'intervention d'aucune traite manuelle ou mécanique. On peut penser que la succion très fréquente des trayons lésés a pu constituer un élément favorable et entraîner leur disparition rapide, résultat souvent constaté dans la maladie spontanée.

Ainsi, la maladie a été reproduite sur deux animaux dont l'un, utilisé dans les conditions habituelles d'exploitation, a présenté des lésions identiques à celles observées dans l'affection naturelle avec une évolution comparable.

En conclusion, il est possible de reproduire une lésion nodulaire cliniquement et histologiquement indifférenciable de la lésion spontanée, à la condition d'utiliser un excipient adjuvant de la virulence (huile minérale). L'étiologie de l'affection naturelle doit donc accorder une part importante aux traumatismes du trayon et à leur souillure par des substances pro-infectantes.

La révélation du pouvoir pathogène des Mycobactéries atypiques, essentiellement saprophytes, avirulentes ou oligovirulentes, paraît donc étroitement soumise à deux caractères :

- la superficialité de la lésion, en rapport avec l'aptitude du germe à cultiver plus abondamment à 20° qu'à 37° ;
- l'importance de facteurs pro-infectieux adjuvants, stimulateurs du faible pouvoir pathogène initial du germe.

IV. — Pouvoir allergène

Il était opportun, en raison des incidences possibles de la thélite nodulaire sur le dépistage de la tuberculose par la tuberculine, d'effectuer, tant sur le cobaye albinos (lignée K) que sur des bovins atteints de la maladie naturelle et expérimentale, une recherche particulière du pouvoir allergène différentiel spécifique et croisé de ces germes entre eux et vis-à-vis des trois variétés du bacille de Koch et du bacille de Johnne.

A) Sensibilisation

1° COBAYES : par une injection sous-cutanée de bacilles tuberculeux humains, bovins, aviaires et atypiques (souche 6040 I.P.) à la dose de 4 mg de bacilles cultivés sur milieu de Loewenstein-Jensen (Bacilles tuberculeux humains, bovins et atypiques) ou sur gélose glycinée (Bacille tuberculeux aviaire), puis *tués par la chaleur*.

2° VACHES : spontanément atteintes ou expérimentalement infectées suivant les techniques exposées dans l'étude du pouvoir pathogène naturellement infectées.

B) Tuberculine et sensitines (+)

Pour la recherche de l'allergie croisée, nous avons utilisé systématiquement quatre réactifs :

- Tuberculine humanobovine synthétique (titre : 25.000 UI/ml) ;
- Tuberculine aviaire (non titrée) ;
- Johnine (non titrée), toutes trois commerciales ;
- « sensitine » spécifique, préparée à l'aide de la souche 6040 I.P.

(*) Le terme de « sensitine », désormais classique, est ici choisi afin d'éviter toute confusion avec la « paratuberculine » ou « Johnine ».

1° PRÉPARATION : de nombreux essais ont visé l'amélioration qualitative et quantitative de la sensitine, appréciée par titrage chimique de l'azote et titrage biologique sur cobaye. Les trois souches isolées au laboratoire ont été cultivées sur milieu solide de Loewenstein-Jensen, puis en milieu liquide de Sauton en vase de Roux, additionnés :

- Milieu 1 : de 1/10^e d'une huile de noyaux interestérifiée, hydrophile et mouillante ;
- milieu 2 : de 1/10^e Cytochrome C et d'un extrait autolytique déshuilé de poisson de mer ;
- milieu 3 : de 1/10^e du mélange de ces trois substances.

Les milieux sont placés à l'étuve à 25°C.

Les cultures les plus importantes ont été obtenues en deux mois dans le milieu 1 contenant le mouillant à partir de la souche 6140 I.P., qui confirme ainsi son caractère eugonique.

A partir des cultures de la seule souche 6040 I.P. sur le milieu 1, 2, 3, 4, quatre sensitines ont été préparées suivant les techniques utilisées pour la préparation de la tuberculine synthétique.

2° TITRAGE : LE TITRAGE CHIMIQUE, effectué par la méthode de Kjeldahl, a fourni les résultats suivants :

- sensitine 1 : 6,351 g/L d'azote protéique ;
- » 2 : 6,10 g/L d'azote protéique ;
- » 3 : 10 g/L d'azote protéique ;
- témoin 4 : 5,824 g/L d'azote protéique.

Le *titrage biologique* sur cobayes albinos lignée K a utilisé 10 cobayes sensibilisés avec la souche 6040 I.P. tuée et inoculés un mois plus tard avec les quatre sensitines pures et diluées à 10⁻¹ et 10⁻³ par voie intradermique à la dose de 1/10^e ml par injection (tableau n° 3). Seuls les cobayes éprouvés avec la sensitine 2 pure présentent au point d'injection une réaction apparente et chiffrable. Elle est caractérisée par une réaction érythémateuse, saillante, chaude, douloureuse, analogue à celle observée dans les réactions tuberculoniques classiques de taille variable (5 mm à 10 mm). Les réactions n'apparaissent qu'avec

le réactif non dilué : il n'est donc pas possible d'effectuer un titrage quantitatif.

Le *titrage sur bovins* s'est enfin révélé inopérant sur les bovins infectés spontanément ou expérimentalement.

Ainsi, aucune correspondance ne s'établit entre la luxuriance de la culture (maximale sur le milieu 1), le titrage chimique (très favorable avec la sensitine 3) et le titrage biologique sur cobaye (positif seulement avec la sensitine 2 pure) et sur bovin (résultats nuls). Devant ces résultats divergents, le choix de la sensitine s'est fondé sur le titrage biologique sur cobaye et a porté sur la sensitine 2 (culture sur milieu de Sauton additionné de Cytochrome C et d'un extrait de poisson, puis extraction classique).

3° REACTIONS ALLERGIQUES CROISEES : elles sont consignées dans le tableau n° 3.

PREMIER TEMPS : SENSIBILISATION PAR M. AQUÆ, PUIS ÉPREUVE PAR LA SENSITINE SPÉCIFIQUE, LES TUBERCULINES ET LA JOHNINE.

a) *Cobaye* :

20 cobayes sont préalablement sensibilisés par la souche 6040 I.P., puis éprouvés après des délais de 1 à 6 mois, afin d'apprécier la cinétique du taux des allerganticorps, par la tuberculine humano-bovine, la tuberculine aviaire, la johnine et la sensitine n° 2. Après épilation du dos des animaux, les réactifs sont injectés par voie intradermique en deux points, à la dose de 1/10^e de ml par rapport à une injection témoin d'eau physiologique isotonique. La tuberculine humanobovine titrant 25.000 U.I. par ml est diluée au 1/250^e, afin d'injecter 10 U.I. par dose. Les autres réactifs sont utilisés sans dilution, car les réactions, lorsqu'elles existent, n'apparaissent qu'avec des produits non dilués. La lecture en millimètres de diamètre s'effectue 24 heures plus tard et se poursuit pendant plusieurs jours.

— Après un mois, des réactions sont apparues chez tous les animaux pour *chacun des réactifs*, mais l'importance des lésions et leur aspect est variable.

La *tuberculine humanobovine* (10 U.I./point d'injection) entraîne des réactions nettes chez tous les animaux à chaque

Sensibilisation	MYCOBACTERIOSE ATYPIQUE						TUBERCULOSE EXPERIMENTALE					
	expérimentale			spontanée			M. tuberculosis			M. tuberculosis		
	inoculation de M. aquae (souche 6040 I.P.)			Bovins atteints de thélie nodulaire			(var. bovis)			(var. avium)		
	Cobaye		Bovin	Bovins atteints de thélie nodulaire		Début non connu	Cobaye		Bovin (après 72 h.)	Bovin		Cobaye (après 72 h.)
Réactifs	1 mois	6 mois		1 mois	6 mois		1 mois	6 mois	1 mois	6 mois	1 mois	6 mois
Sensitine de M. aquae (s. 6040 I.P.)	++	+	0	+	0	0	++	+	0	+	0	0
Tuberculine humano-bovine	+++	++	++	++	++	+++	+++	±	+++	+	±	++
Tuberculine Johnine	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	+++
aviaire	+	0	++	+	0	0	+	0	0	+	0	0

N.B. — I. Les croix correspondent :

- a) chez le cobaye, au diamètre des lésions
(mesuré au pied à coulisse)
- ++ lésions comprises entre 3 et 5 mm
 - +++ lésions comprises entre 7 et 9 mm
 - ++++ lésions comprises entre 10 et 12 mm
 - +++++ lésions supérieures à 12 mm

b) chez les bovins, à la différence (Δ) entre les épaisseurs du pli cutané mesurées en mm. avant et après l'épreuve (épaisseur initiale 10 mm.).

- +++ $1 < \Delta < 2,5$
- +++ $5 < \Delta < 10$
- +++ $2,5 < \Delta < 5$
- +++ $\Delta > 10$

II. Cadre plus épais : allergie spécifique.
Tout le reste = allergie croisée.

point d'injection, caractérisées par une réaction inflammatoire rouge, chaude, douloureuse, nettement circonscrite, de diamètre variant de 6 mm à 10 mm et diminuant progressivement de volume les jours suivants.

La *tuberculine aviaire* procure des réactions positives observées chez tous les animaux et à chaque point d'injection, mais plus importantes que celles constatées avec la tuberculine humanobovine. Mais rappelons que ce réactif commercial non titré n'a pas été dilué, alors que la tuberculine humanobovine était injectée à raison de 10 U.I. Cependant, l'aspect des lésions diffère remarquablement des précédentes : on constate, en effet, dès la première lecture, une *nécrose cutanée*, alors qu'avec les autres tuberculines les lésions sont du type seulement inflammatoire.

La *johnine* donne des réactions positives chez la plupart des animaux, mais beaucoup plus petites, de type inflammatoire faible ; leur diamètre varie de 4 mm à 8 mm.

La sensitine spécifique déjà étudiée lors du titrage biologique sur cobaye montre que la seule sensitine n° 2 provoque, chez le cobaye spécifiquement sensibilisé, l'apparition de réactions positives identiques à celles observées avec la tuberculine humanobovine et d'un diamètre variable de 5 à 10 mm.

— Après 6 mois, les réactions sont beaucoup moins nettes et diminuent d'importance.

En conclusion, chez les cobaye, *M. aquæ* (souche 6040 I.P.) sensibilise spécifiquement cette espèce et procure des réactions d'allergie croisée avec les bacilles tuberculeux bovin et aviaire et le bacille de Johnne. Les réactions les plus nettes en dimension et en aspect (*nécrose cutanée*) sont observées chez les animaux éprouvés par la tuberculine aviaire. Des coallergènes existent donc entre la souche et les autres mycobactéries étudiées, spécialement le bacille tuberculeux aviaire.

b) Bovins :

— Animaux expérimentalement infectés par la souche 6040 I.P. par voie intradermique : 2 vaches non réagissantes ont été inoculées avec cette souche, l'une en fin de lactation, l'autre en début de lactation. Ces animaux ont été ensuite tuberculinisés

un mois, puis 3 et 6 mois après, à l'aide de la tuberculine humanobovine, la tuberculine aviaire, la johnine et la sensitine n° 2, suivant la technique de l'intradermoréaction seconde et simultanément avec mensuration des plis cutanés à chaque lecture, après 24 heures, 48 heures et 72 heures.

Comme nous l'avons envisagé dans l'étude du pouvoir pathogène, seul l'animal n° 1 en fin de lactation a présenté une thélite nodulaire évolutive après inoculation d'un mélange de paraffine et de germes et a réagi à l'injection des tuberculines humanobovine et aviaire par l'apparition des lésions identiques à celles observées dans le dépistage de la tuberculose par la tuberculine.

Initialement, cet animal ne réagissait pas à l'injection des divers réactifs.

Un mois après l'inoculation (tableau n° 3), si cette lecture est interprétée de la même manière que l'intradermoréaction seconde dans le dépistage de la tuberculose, on peut conclure que l'animal n'a pas présenté de réactions à l'injection de tuberculine humanobovine, johnine et paratuberculine (R —) ; en revanche, il montre une réaction douteuse après injection de tuberculine aviaire puisque le diamètre de la lésion est compris entre une fois-et-demi et deux fois l'épaisseur initiale (R ±).

Après trois mois, l'animal présente une réaction nettement positive lors du déchaînement par la tuberculine aviaire (épaisseur du pli cutané supérieure au double de l'épaisseur initiale) et une réaction douteuse après injection de tuberculine humanobovine. Ainsi, *une allergie croisée entre bacille paratuberculeux et bacille tuberculeux existe chez la vache atteinte de thélite nodulaire expérimentale. Les réactions positives sont observées avec la tuberculine aviaire, les réactions douteuses avec la tuberculine humanobovine ; les réactions négatives avec les paratuberculines spécifique ou non spécifique (Johnine).*

— *Animaux naturellement infectés* : les mêmes opérations de tuberculinisation ont été réalisées chez 6 vaches présentant une thélite nodulaire spontanée caractéristique.

3 vaches sur 6 ont présenté une réaction positive après injection de tuberculine humanobovine, les autres des réactions douteuses. Tous les animaux réagissent d'une manière douteuse

à la tuberculine aviaire (2 cas de nécrose), aucun avec la johnine et la paratuberculine.

Par suite, *les animaux atteints naturellement de thélite nodulaire semblent réagir, après injection de tuberculines, soit nettement, soit de manière douteuse, ainsi que l'ont constaté un grand nombre de praticiens qui redoutent que la thélite nodulaire ne constitue éventuellement un certain obstacle dans le dépistage de la tuberculose par la tuberculinisation.*

Cependant, la lecture du tableau n° 3 appelle quelques remarques :

1° Le délai d'apparition de l'état d'hypersensibilité est relativement long (3^e mois). Avec la tuberculine humanobovine, la réaction est à peine progressive et peu durable, puisqu'elle apparaît à la 48^e heure et disparaît ensuite. Ceci tient, sans doute, à la faiblesse des allergènes de ces mycobactéries atypiques.

2° *Dans la thélite expérimentale, la réaction est douteuse avec la tuberculine humanobovine.* Aussi les phénomènes d'allergie croisée avec les bacilles tuberculeux ne semblent-ils pas constituer un obstacle sérieux à la prophylaxie de la tuberculose bovine, et les animaux atteints de thélite spontanée présentant une réaction nette à l'injection de tuberculine humanobovine doivent être considérés comme certainement tuberculeux.

3° L'apparition de réactions avec la tuberculine aviaire montre tout l'intérêt qu'il y aurait, dans le cas de réactions douteuses avec la tuberculine humanobovine, à réaliser une double tuberculinisation avec la tuberculine humanobovine d'une part, la tuberculine aviaire d'autre part. Si ces animaux ne réagissent pas à l'injection de tuberculine aviaire, il est permis de penser qu'ils présentent une certaine hypersensibilité vis-à-vis des bacilles tuberculeux humain ou bovin et, par suite, qu'ils sont tuberculeux s'ils se trouvent en milieu contaminé.

Si la réaction est douteuse, il faut rechercher les causes de l'hypersensibilité, dans une affection éventuelle à bacilles paratuberculeux. Enfin, si la réaction est franchement positive, deux cas peuvent être envisagés : une tuberculose à bacille

aviaire typique ou atypique, ou une paratuberculose à bacilles acido-alcool-résistants. Dans tous les cas, l'examen clinique de l'animal doit être réalisé avec recherche d'une thélite nodulaire.

DEUXIÈME TEMPS : SENSIBILISATION PAR LES BACILLES TUBERCULEUX ET ATYPIQUES, PUIS ÉPREUVE PAR LA SENSITINE SPÉCIFIQUE, LES TUBERCULINES ET LA JOHNINE.

a) *Cobayes* : 30 cobayes sont répartis en trois lots de 10 cobayes, chacun sensibilisé respectivement par des bacilles tuberculeux bovins tués, par des bacilles aviaires tués et par des bacilles atypiques de la souche 6040 I.P. Ce dernier lot constitue un lot témoin qui permet de *contrôler* la première épreuve où les cobayes ont été aussi sensibilisés par la souche 6040 I.P. et éprouvés par les différents réactifs, selon le même protocole.

Dans cette expérience, nous avons utilisé, outre la sensitine préparée par nos soins, les tuberculines humanobovine et aviaire et la johnine.

Les animaux sensibilisés par les différents bacilles tuberculeux ont réagi classiquement à l'injection des extraits correspondants.

D'autre part, l'allergie provoquée par les bacilles tuberculeux bovin et aviaire est révélabile par la sensitine, mais les réactions sont moins nettes et de dimensions inférieures à celles observées dans l'expérience précédente : en effet, le diamètre des lésions, exclusivement inflammatoires, varie pour les animaux sensibilisés par des bacilles bovins entre 7 et 9 mm, et pour les animaux sensibilisés par des bacilles aviaires entre 3 et 6 mm.

Après 6 mois, on note chez tous les animaux une diminution de l'état d'hypersensibilité. Néanmoins, les lésions les plus importantes sont toujours observées avec la tuberculine aviaire.

Il faut souligner que, 6 mois après la sensibilisation, l'état d'hypersensibilité est plus marqué avec les bacilles atypiques, aussi bien dans la recherche de l'allergie directe que dans celle de l'allergie croisée. Ainsi, le diamètre des lésions chez les cobayes sensibilisés par un bacille bovin et déchainé par la tuberculine humanobovine est compris entre 3 et 6 mm, alors

que chez les cobayes sensibilisés par le bacille atypique et déchainés par la même tuberculine humanobovine, le diamètre des lésions est compris entre 7 et 9 mm.

Il en est de même avec la tuberculine aviaire, mais les réactions nécrotiques ont disparu.

b) *Bovins* : Deux vaches ont été inoculées, l'une avec *Mycobacterium var. bovis* (souche Nancy), l'autre avec *Mycobacterium var. aerium*. Ces animaux réagissent normalement à l'épreuve par les tuberculines humano-bovine et aviaire ; en revanche, aucune réaction n'apparaît avec la johnine et la sensitine.

Notons enfin que *les phénomènes d'hypersensibilité persistent plus longtemps chez le cobaye paratuberculeux ou la vache* que chez les cobayes sensibilisés avec un bacille bovin ou aviaire et semblent même supérieurs, trois mois après l'inoculation, à ceux observés un mois après cette inoculation.

Ceci provient sans doute de l'insuffisance de nos réactifs. Il est d'ailleurs impossible de révéler l'allergie spécifique par les paratuberculines chez des vaches atteintes naturellement ou expérimentalement de thélite noudulaire. Il faudra donc envisager de nouvelles fabrications de paratuberculines, utilisables chez les gros animaux.

CONCLUSIONS

- 1° Les mycobactéries atypiques constituent un ensemble de germes acido-alcool-résistants de différenciation et de systématique encore assez délicates et controversées, saprophytes mais éventuellement pathogènes pour l'Homme et les animaux.
- 2° Trois souches de bacilles acido-alcool-résistants ont été isolées à partir de prélèvements provenant de thélite nodulaire de la vache laitière. Les caractères cultureux biochimiques, pathogènes et allergènes, les signalent comme des *Mycobactéries atypiques scotochromogènes appartenant au groupe II de Runyon*, et plus particulièrement comme trois variétés de *Mycobacterium aquæ*, dont l'une se sépare assez nettement des deux autres.
- 3° L'affection a pu être reproduite chez la vache avec un mélange, par inoculation, dans le trayon, d'une suspension du germe spécifique dans de l'huile de paraffine. Les germes semblent présenter un certain pouvoir pathogène pour le cobaye et la souris (lésions spléniques et hépatiques).
- 4° Le pouvoir sensibilisant de ces bacilles a fait l'objet d'une étude spéciale chez le cobaye et chez la vache.
Une allergie croisée existe entre *M. aquæ* et les trois variétés de bacilles tuberculeux, surtout avec le bacille tuberculeux aviaire, ainsi que le bacille de John.
- 5° L'irrégularité des exigences métaboliques de germes à l'isolement et en subculture, les différences observées dans leur comportement culturel biochimique, voire biologique, laissent supposer une étiologie très diverse à la thélite nodulaire, dont les diverses variétés de *M. aquæ* ne seraient peut-être que les responsables les plus fréquents et non exclusifs.

6° La fréquence actuelle de l'affection bovine et sa communauté allergique avec les autres mycobactéries risquent de fausser, dans certains cas, le dépistage tuberculinique de la tuberculose bovine et réclameraient peut-être la mise en œuvre d'une réaction double comparative humanobovine et aviaire en raison de la particulière réactivité de la tuberculine aviaire vis-à-vis de *M. aquæ*.

Vu : LE PROFESSEUR RESPONSABLE
DE L'ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE,
JOUBERT.

Vu : LE DIRECTEUR
DE L'ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE,
FLORIO.

Vu :
LE DOYEN
DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE,
J.-F. CIER

Vu :
LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE,
MONNET.
PROFESSEUR
DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE.

Vu et permis d'imprimer : Lyon, le 28 Février 1964.

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ
P. LOUIS

BIBLIOGRAPHIE

- (1) ADACHI (K). — Studies on atypical acid-fast bacilli. II : Virulence of atypical acid-fast bacilli. *Sci. Rep. Res. Inst. Tohoku Univ.*, 1960, 9, 25-33.
- (2) AGIUS (E.). — Une mycobactérie pathogène rare. *Ann. Inst. Pasteur (Tunis)*, 1956, 33, 245.
- (3) ANDREJEW (A.), TACQUET (A.) et GERNEZ-RIEUX (Ch.). — Activité catalasique des Mycobactéries. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, 1956, 91, 767.
- (4) ANDREJEW (A.), GERNEZ-RIEUX (Ch.) et TACQUET (A.). — Activité peroxydasique des Mycobactéries. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, 1956, 91, 586.
- (5) — Cytochromes et activité cytochrome-oxydasique des mycobactéries sensibles et résistantes à l'I.N.H. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, 1957, 93, 281-288.
- (6) — Activité lipasique des bacilles tuberculeux et des mycobactéries atypiques. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, 1960, 99, 56.
- (7) — Essais de différenciation des Mycobactéries sensibles et résistantes à l'INH à l'aide de tests quantitatifs et qualitatifs de l'activité peroxydasique. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, 1960, 99, 821.
- (8) ARIMA (I.), YAMAMOTO (K.), MOCHIZUKI (K.) et TAKAHASHI (Y.). — Evolution rapide de la virulence des bacilles tuberculeux par la méthode de culture de tissu. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 1959, 153, 883.
- (9) ARIMA (I.), YAMAMOTO (K.) et MORIKAWA (K.). — Virulence des mycobactéries dites atypiques mesurée par la méthode de culture de tissu. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 1960, 154, 2404-2407.
- (10) ARTIOLI (D.) et GIANELLI (F.). — *Archivio. Vet. Ital.*, 1952, 3, 485.
- (11) ASSELINEAU (I.) et LEDERER (E.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1950, 230, 142.

- (12) ATWELL (P.-E.) et DYKE (L.-M.). — *Ann. Jour. Hyg.* 1960, 71, 204.
- (13) AUGIER (J.). — Apport de la microscopie en fluorescence dans l'étude et la recherche des bacilles acido-résistants. *Thèse Doct. Méd. Paris*, 1949.
- (14) BADIALI (L.), DE MAJO (F.), BARBABELLA (V.) et CURCIO (G.-B.). — Pathogenicity of atypical mycobacteria. Studies on fowls and pigs. *Vet. Ital.* 1963, 14, 219-240.
- (15) BARIETY (M.), GAJDOS (A.), GAJDOS-TOROK (M.) et SIFFERLEN (S.). — Signification et nature des porphyrines synthétisées par les bacilles tuberculeux et paratuberculeux. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, 1957, 93, 552.
- (16) BARRETO (R.-C.-R.) et LORIAN (V.). — Méthodes de détection de la nyacine dans les cultures de mycobactéries. *La Presse Médicale (Paris)*, 1963, 71, 873.
- (17) BAUMANN (R.), KRENN (E.) et LIEBISH (H.). — Lymphadénite caséuse du Porc. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, 1956, 43, 341-345.
- (18) BECK (A.). — Atypical acid-fast bacilli in pulmonary disease. *J. Path. Bact.* 1959, 77, 615-624.
- (19) BECK (A.). — Skin sensitization of guinea pigs with atypical acid-fast bacilli. *J. Path. Bact.* 1960, 79, 285-288.
- (20) BECK (F.). — Pulmonary disease due to atypical tubercle bacilli. *Amer. Rev. Respir. Dis.* 1959, 37, 227-244.
- (21) BELL (J.-C.) et RIEMENSNIDER (D.). — Studies of non tuberculosis acid-fast bacilli recovered from human sources. Bacterial studies. *Amer. Rev. of Tub.*, 1957, 76, 683-696.
- (22) BENOIT (R.) et DAPPLES (Ch.). — *Schweiz. Archiv. f. Tbk.* 1952, 94, 523.
- (23) BERTHELON (M.) et TOURNUT (G.). — Le granulome de Roëckl est-il curable par la streptomycine ? *Rev. Méd. Vét.* 1952, 15, 321.
- (24) BLEIKER (M.-A.). — *Proc. Tuberc. Res. Conn.*, 1959, 46, 13.
- (25) BLOCH (H.). — Enzymatic characteristics of suspensions of different mycobacteria. *Amer. Rev. Tub.* 1950, 61, 270.

- (26) BOISVERT (H.). — La culture des Mycobactéries sur gélose nutritive. Son intérêt relatif pour différencier les bacilles tuberculeux et paratuberculeux. *Ann. Inst. Pasteur* (Paris), 1955, 88, 84-94.
- (27) BOISVERT (H.). — L'identification des Mycobactéries par la recherche de l'acide nicotinique. *Ann. Inst. Pasteur* (Paris), 1960, 99, 600-607.
- (28) BOISVERT (H.). — L'identification des Mycobactéries par l'épreuve de réduction des nitrates. *Ann. Inst. Pasteur* (Paris), 1961, 100, 352.
- (29) BOJALIL (L.-P.). — Frequency and epidemiologic significance of unclassified Mycobacteria in Mexico. *Amer. Rev. Respir. Dis.* 1961, 83, 596-599.
- (30) BÖNICKE (R.). — Classification des Mycobactéries à l'aide des épreuves chimiques. *Bull. Un. Inter. Tuberc.* 1958, 28, 162-164.
- (31) BÖNICKE (R.). — Contribution au diagnostic des Mycobactéries par les réactions « in vitro ». *Bull. Un. Inter. Tuberc.* 1959, 29, 83-84.
- (32) BÖNICKE (R.). — Mycobactéries. *Bull. Un. Inter. Tuberc.* 1962, 32, 13.
- (33) BÖNICKE (R.). — Die Klassifizierung « atypischen » Mycobakterien durch Bestimmung ihrer unterschiedlichen acylamidatischen Stoffwechselleistungen. *Tuberkulose-arzt.* 1960, 14, 209-216 (Abstract).
- (34) BÖNICKE (R.), RÖHRSCHIEDT (E.) et PASCOE (A.). — Die Verbreitung der Nitratreduktase innerhalb der Gattung « Mycobacterium ». *Naturwissenschaften* 1962, 49, 43-44.
- (35) BÖNICKE (R.), RÖHRSCHIEDT (E.) et TUNÇMAN (S.). — Methylamin als Metabolit des enzymatischen Abbaues von Methylharnstoff durch « Mycobacterium phlei ». *Naturwissenschaften*, 1962, 49.
- (36) BÖNICKE (R.). — Vergleichende Untersuchungen über den Stoffwechsel der verschiedenen Arten und Varianten der Gattung « Mycobakterien » (Möglichkeiten einer Stoffwechsel-systematik der Tuberkelbakterien). *Tuberk. Forsch. Inst. Borstel.*, 1956-1957, 4, 43-172 (abstract).
- (37) BÖNICKE (R.). — « Atypische » Tuberkulose Bakterien. *Beitrage zur Klinik der Tuberkulose*, 1959, 121, 160.
- (38) BÖNICKE (R.) et LISBOA (B.-P.). — Über das Vorkommen von Acylamidasen in Mycobakterien. I : Die enzymatische Desamidierung aromatischer und aliphatischer Carbonsäureamide. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.*, 1959, 175, 403-421.

- (39) BÖNICKE (R.), DITTMAR (W.) et LISBOA (B.-P.). — Über das Vorkommen von Acylamidasen in Mycobakterien. — II. - Der enzymatische Abbau von Harnstoff (urease). *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.*, 1960, 177, 380-283.
- (40) BÖNICKE (R.), DITTMAR (W.) et LISBOA (B.-B.). — III. - Der enzymatische Abbau von Allantoïn. *Ibid.*, 1960, 178, 186-194.
- (41) BÖNICKE (R.), DITTMAR (W.) et LISBOA (B.-P.). — IV - Die Differenzierung schnell wachsender Mycobakterien der Species « *M. smegmatis* », « *M. phlei* », « *M. fortuitum* » und « *M. thamnophae* » durch Nachweis ihrer unterschiedlichen acylamidatischen Stoffwechselleistungen. *Ibid.*, 1960, 179, 209-223.
- (42) BÖNICKE (R.), DITTMAR (W.) et LISBOA (B.-P.). — V. - Die Identifizierung von « atypischen » Mycobakterien der photochromogenen Gruppe mit Hilfe der « Amid-Reihe ». *Ibid.*, 1960, 179, 223-230.
- (43) BONCIU (G.), BONCIU (O.), PETROVICI (M.) et DEMETRESCO R. — Contribution à l'étude de l'action pathogène expérimentale des bacilles paratuberculeux isolés de l'eau et de la boue du lac noir de Sovata. *Arch. Roum. de Path. Exp. Bucarest*, 1960, 19, 419.
- (44) BOSCO (G.). — Affezioni simil Tubercolari in lesioni riportate nelle piscine. *Nuov. Ann. Ig. Microbiol.*, 1958, 9, 281-284.
- (45) BOZEMAN (F.-M.) DOETSCH (R.-N.) et FABER (J.-E.). — Some physiological properties of nonpathogenic mycobacteria. *J. Infect. Dis.* 1951, 89, 185-189.
- (46) BRANDES (H.). — Différenciations macroscopiques des lésions tuberculeuses et des lésions tuberculiformes des ganglions mésentériques du Porc. *Archiv. für Lebensmittelhygiene*, 1961, 12, 53.
- (47) BROSBE (E.-A), SUGIHARA (P.-T.). et SMITH (C.-R.). — Growth characteristics of Mycobacterium avium and group IV non photochromogenic mycobacteria in Hela cells. *J. Bact.* 1962, 84, 1282-1286.
- (48) BRUYNOCHE (R.) et ADANT (M.). -- Un bacille paratuberculeux. *C. R. Soc. Biol.*, 1932, 111, 1051-1052.
- (49) BUHLER (V.-B.) et POLLAK (A.). — Human infection with atypical acid-fast organisms. Report of two cases with pathological fundings. *Amer. J. Clin. Path.* 1953, 23, 363.
- (50) BURGISSER (H.). — Présence de Mycobactéries dans deux cas de granulome de Roëckl. *Schw. Arch. Kierkeilk.* 1958, 100, 503.

- (51) CANETTI (G.). — *Rev. Tuberc. Paris*, 1961, 25, 710.
- (52) CANHAM (A.-S.). — The Tuberculin test in guinea-pigs and cattle. The allergic response of animals to tuberculin and extracts of non pathogenic acid-fast bacteria. *Onderstepoort J. Vet. Sci.* 1944, 19, 25. (*Abst. in Vet. Bull.* 1947, 17, n° 527).
- (53) CARPENTER (Ch.) et GOLDBERG (S.). — *Cornell Vet.*, 1925, 15, 148.
- (54) CATTANEO (C.), MORELLINI (M.), ORTALI (V.) et PENSO (G.). — Etudes et recherches sur les mycobactéries : action de l'acide p-amino-salicylique sur les Mycobactéries. Différenciation entre les mycobactéries tuberculeuses et paratuberculeuses. *R. C. Inst. Super. Sanita*, 1950, 13, 390.
- (55) CHAPMANN (J.-S.). — The anonymous Mycobacteria in human diseases. Ch. Thomas, éd. Springfield, U.S.A., 1960.
- (56) CHOUCROUN (N.). — Sur un antigène sensibilisant extrait du bacille tuberculeux. *C. R. Acad. Sci.* 1939, 208, 1757.
- (57) CLAPP (K.-H.). — Lésions tuberculiformes du porc en Australie du Sud. *The Australian Veterinary Journal*, 1956, 32, 110.
- (58) CLEER (R.-L.), MOLLOHAN (C.-S.) et ROMER (M.-C.). — *Rocky Mountain Med. J.*, 1961, 58, 31.
- (59) COBBETT (L.). — *Brit. Med. J.*, 1918, 2, 188.
- (60) CONTART (M.). — Contribution à l'étude expérimentale de la virulence des Mycobactéries. *Thèse Doct. Vét. Alfort*, 1955.
- (61) COSTER (J.-F.) et MANTEN (A.). — A simple technique for the differentiation of tubercle bacilli and saprophytic bacteria. *Amer. Rev. Tub.*, 1956, 74, 958.
- (62) COURTOIS (P.). — Contribution à l'étude des Mycobactéries. Recherches sur les qualités immunisantes antituberculeuses d'un bacille acido-résistant avirulent. *Thèse Doct. Vét. Lyon* 1957.
- (63) CRAWFORD (A.-B.). — *J.A.V.M.A.*, 1926, 69, 579.
- (64) CRAWFORD (A.-B.). — Tuberculin reactions in cattle showing non visible tuberculosis lesions on post mortem. *J. Amer. Vet. Med. Ass.* 1936, 89, 562.
- (65) CROW (H.-E.), KING (C.-T.), SMITH (E.), CORPE (R.-T.) et STERGUS (I.). — A limited clinical pathologic and epidemiologic study of patients with pulmonary lesions associated with atypical fast bacilli in the sputum. *Amer. Rev. Tub.* 1957, 75, 199.
- (66) CSILLAG (A.). — Morphological and biochemical features of « atypical » mycobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 1961, 24, 261-272.

- (67) DAINES (L.-L.) et AUSTIN (H.). — *J.A.V.M.A.*, 1932, 80, 414.
- (68) DEGOMMIER. — Coloration. *Ann. Inst. Pasteur* 1957, 92, 692.
- (69) DERIVAUX (J.), SCHOENAERS (F.) et BIENFET (V.). — Un cas généralisé de granulome de Roëckl. Essai de transmission expérimentale. *Ann. Méd. Vét.* 1956, 100, 16-32.
- (70) DESBORDES (J.) et FOURNIER (Et.). — Contribution à l'étude de la physiologie des bacilles acido-alcoolo-résistants : l'équipement enzymatique, la virulence et les indicateurs colorés de rH. *Ann. Inst. Pasteur* (Paris), 1950, 79, 210.
- (71) DESBORDES (J.). — Mise en évidence *in vitro* de la « non-virulence » des germes a.a.r. par une réaction au bleu de Nil. *Ann. Inst. Pasteur* (Paris), 1952, 83, 809.
- (72) DESBORDES (J.). — Etude du pouvoir antibiotique de l'acide p-amino-salicylique sur « *Mycobacterium tuberculosis* ». Toxicité propre de l'acide p-amino-salicylique pour le bacille de Koch. *C. R. Soc. Biol.* 1952, 146, 73.
- (73) DESBORDES (J.). — Contribution à l'étude du mécanisme d'action des cyto-tests bactériologiques en relation avec la virulence des *Mycobactéries*. *Ann. Pharm. Franç.* 1954, 12, 361-375.
- (74) DESBORDES (J.) et FOURNIER (Et.). — A propos de la fixation des colorants basiques sur les *Mycobactéries*. Réduction enzymatique du bleu de méthylène par le bacille de phléole. *C. R. Soc. Biol.* 1951, 145, 1862-1864.
- (75) DESBORDES (J.). — Essai sur les conséquences des variations constatées actuellement dans la physiologie de certaines *mycobactéries*. *Rev. Imm.* 1963, 27, 241.
- (76) DESBORDES (J.) et FOURNIER (Et.). — Action des substances colorantes sur les *mycobactéries*. - I. : Etude de la cinétique de la réaction. *Ann. Inst. Pasteur* (Paris), 1954, 86, 657.
- (77) DESBORDES (J.), FOURNIER (Et.) et ALIX (D.). — Action des substances colorantes sur les *mycobactéries*. - II. : Colorants basiques. Influence du pH.
- (78) DESBORDES (J.), FOURNIER (Et.) et ALIX (D.). — III. : Colorants basiques. Influence du lavage préalable avec différents solvants des lipides. *Ann. Inst. Pasteur* (Paris), 1955, 88, 240-243.
- (79) DESBORDES (J.), FOURNIER (Et.) et ALIX (D.). — IV. : Colorants acides. Influence du pH. *Ann. Inst. Pasteur* (Paris), 1955, 88, 719-723.

- (80) DESPIERRES (G.), GALY (P.), VIALLIER (J.) et BONNET (P.-A.)
— Le rôle possible d'un bacille acido-résistant atypique non pathogène dans l'évolution fatale d'une silicose pulmonaire. *Lyon Méd.*, 1959, 201, 659-663.
- (81) DESPIERRES (G.), GALLY (P.), VIALLIER (J.) et VAUZELLE (J.). — Silicose tumorale unilatérale et bacilles acido-résistants chromogènes atypiques. *Rev. Tuberc. Paris*, 1959, 23, 204-213.
- (82) DESPIERRES (G.) et VIALLIER (J.). — Pneumopathies à bacilles chromogènes atypiques. *Soc. Méd. des Hôpitaux de Lyon*, 19 mars 1962.
- (83) DEVULDER (B.). — Les infections humaines à mycobactéries dites atypiques. *Thèse, Lille* 1962.
- (84) DIENES (L.) et SHOERSHEIT (E.-W.). — Certain characteristics of the infections processus in connection with the influence exerted on the immunity response. *J. Immunol.* 1910, 19, 41.
- (85) DOSCH (F.). — Die Mykobakteriellen Infekte des Hühnerembryo unter besonderer Berücksichtigung der Resultate nach intravasaler Infektion. *Zbl. Bakt. I.* 1956, 165, 391-423.
- (86) DUBOS et MIDDLE BROOK. — Cytochemical reactions of virulence tubercle bacilli. *Amer. Rev. Tub.* 1948, 58, 698.
- (87) EDWARDS (L.-B.), EDWARDS (P.-Q.) et PALMER (C.). — *Acta Tuberc. Scand.* 1953, suppl 47, 77-97.
- (88) EDWARDS (L.-B.) et PALMER (C.-E.). — Isolation of « atypical » myco-bacteria from healthy persons. *Amer. Rev. Respir. Dis.* 1959, 80, 747-749.
- (89) EISNEROVA (R.), HORAK (Z.) et KADERA (J.). — Scotochromogenic myco-bacteria in culture from laryngeal swabs. *Roz bledy Tuberk.* 1962, 22, 444.
- (90) ENGBAEK (H.-C.). — Differentiation between tubercle bacilli and acid-fast saprophytes for diagnostic purpose. *Acta Path. Microb. Scand.* 1954, 34, 68.
- (91) ENGBAECK (H.-C.) et MAGNUSSON (M.). — A bacteriological study of the pathogenic significance of atypical myco-bacteria isolated from eleven patients. *Acta. Tuberc. Scand.* 1961, 40, 1-34.
- (92) ENGBAECK (H.-C.). — Pathogenicity and virulence of atypical myco-bacteria for experimental animals with particular reference to pathological processes in the joints and tendon sheaths of rabbits. *Acta Tuberc. Scand.* 1961, 40, 35-40.

- (93) ENGBAECK (H.-C.). — The sensitivity of atypical mycobacteria to sodium hydroxyde and a surface active agent (« Teepol »). *Acta Tuberc. Scand.* 1962, 42, 1-9.
- (94) EUSTATZIOU (S.), MEITERT (E.), TULPAN (G.), ANTOHI (M.) et EUSTATZIOU (G.). — Contribution à l'étude des souches de Mycobactéries saprophytes et atypiques. Note 1 : Etude des caractères morphologiques, culturels, biochimiques et de la sensibilité aux antibiotiques. *Arch. Roum. de Path. Exp.* (Bucarest), 1960, 19, 583-600.
- (95) EUSTATZIOU (E.), EUSTATZIOU (G.), MEITERT (E.), ANTOHI (M.) et BOGDANESCU (W.). — Recherches sur les systèmes phago-bactériens chez les mycobactéries saprophytes et pathogènes. *Arch. Roum. de Path. Exp.* (Bucarest) et *Microbio.* 1961, 20, 461-468.
- (96) FALKENA (R.). — Mycobactéries anonymes. *Tijdschrift voor Diergenees Kunde*, 1962, 87, 473-489.
- (97) FELDMAN (W.-H.), KARLSON (A.-G.) et HERRICK (F.). — « *Mycobacterium ulcerans* ». Pathogenesis of infection in mice including determinations of dermal temperatures. *Amer. J. Path.* 1957, 33, 1163-1173.
- (98) FENNER (F.) et LEACH (R.-H.). — *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 1952, 30, 1.
- (99) FENNER (F.). — The pathogenic behaviour of « *Mycobacterium ulcerans* » and « *Mycobacterium balnei* » in mouse and the developping chick embryo. *Amer. Rev. Tuberc.* 1956, 73, 650-673.
- (100) FINCHER (M.-G.), EWANS (W.-M.) et SAUNDERS (L.-Z.). — *Cornell Vet.*, 1957, 44, 240.
- (101) FLORENCE (H.). — Atypical fast (chromogenic) organisms complicating pulmonary disease. *Dis. of chest.* 1956, 30, 250-276.
- (102) di FONZO (M. DI). — Purine enzymes in Mycobacteria. *Amer. Rev. Tuberc.* 1952, 66, 240-243.
- (103) FOURNIER (F.), LAROCHE (M.-J.) et PENARD (M.-Th.). — Etude de l'évolution de bacilles paratuberculeux et aviaires par diffraction aux rayons X. *Ann. Inst. Pasteur* (Paris), 1962, 26, 320.
- (104) FRANCIS (J.). — The behaviour of various mycobacteria in the chick and duck embryo. *Amer. Rev. Tuberc.* 1956, 73, 276-290.
- (105) FREERKSEN (E.) et LAUTERBACH (D.). — Über die Auslösbarkeit von Tuberkulinreaktionen nach Verfütterung atypischen Mycobakterienstämme beim Rinde. *Zbl. Bakt. I.* 1960, 180, 217-220.

- (106) FREERKSEN (E.) et LAUTERBACH (D.). — Zur Bedeutung und Differenzierung von sag « unspezifischen » Tuberkulinreaktionen. *Zbl. Vet. Med.* 1961, 8, 158-174.
- (107) FREIRKSENEND (E.) et LAUTERBACH (D.). — Über den Ruslos Barkeit von Tuberkulin Reaktionen in achter Fütterung atypischer Mykobakterinstamm beim Rende. *Zentralblatt Bakt.* 1960, 180, 217.
- (108) FREY (C.-A.) et HAGAN (W.-A.). — The distribution of acid fast bacteria in soils. *J. Infect. Dis.* 1931, 49, 496.
- (109) GALE (D.). — Studies of unclassified mycobacteria. I. « In vivo » response and morphologic studies of a photochromogen. *Amer. Rev. Respir. Dis.* 1961, 83, 718-727.
- (110) GARDNER (M.) et WEISER (R.-S.). — A bacteriophage for Mycobacterium smegmatis. *Proc. Soc. Exper. Biol. et Med.* october 1957, 66, 205.
- (111) GERMAN (A.), JUND (Y) et PANOUSE-PERRIN (J.). — Méthodes actuelles permettant l'identification des bacilles « paratuberculeux ». *Ann. Pharm. Franç.* 1957, 15, 653-666.
- (112) GERNEZ-RIEUX (Ch.), TACQUET (A.) et MACQUET (V.). — Etude du pouvoir pathogène pour l'animal, des mycobactéries. Influence du virus grippal et du quartz sur l'infection expérimentale. *Ann. Inst. Pasteur (Lille)*, 1958-1959, 10, 9-28.
- (113) GERNEZ-RIEUX (C.), TACQUET (A.) et GERVOIS (M.). — Les Mycobactéries atypiques. Bactériologie, pathologie, épidémiologie. *Maroc Médical*, 1963, 42, 404-419.
- (114) GERNEZ-RIEUX (Ch.) et TACQUET (A.). — Les infections humaines à Mycobactéries atypiques au cours des pneumoconioses. Etude clinique et expérimentale. *Bull. Union Intern. contre la tuberculose*, 1959, 29, 330-342.
- (115) GERNEZ-RIEUX (Ch.), TACQUET (A.) et MACQUET (V.). — Les affections pulmonaires dues aux Mycobactéries atypiques. *Sem. Hôp. Paris (Path. Biol.)*, 1960, 8, 1667-81.
- (116) GÉRONIMUS (L.-H.) et BIRKELAND (J.-M.). — The relationship between the virulence of tubercle bacilli and the vigor of their oxidative attach upon certain substrates. *Amer. Rev. Tub.* 1956, 64, 520.
- (117) GEURDEN (L.). — Introduction à l'étude des Mycobactéries et des Mycobactérioses. 1^{er} Colloque Intern. sur les Mycob. 4-5 et 6-12-1959. *Inst. Méd. Trop. Prince Léopold.*

- (117 bis) Mc GALLUM (J.). — Application des réactions de Dubos-Middlebrook et de Desbordes à « *Mycobacterium ulcerans* ». *Ann. Int. Pasteur* (Paris), 1954, 87, 97-99.
- (118) GEURDEN (L.-M.-G.), DEVOS (A.) et van den WINGAERT (M.). — Recherches sur l'inhibition in vitro des mycobactéries. *Med. Veeartsenijschool Ghent*, 1959, 3, 7-68. (*Abstr. in Veterinary Bulletin*)
- (119) GEURDEN (L.-M.-G.), LAMBELIN (G.), DEVOS (A.), ECTORS (F.), STAELENS (L.). — Essai d'identification de 20 souches africaines de mycobactéries d'origine bovine. *Med. Veeartsenijschool Ghent*, 1961, 5, 26.
- (120) GEURDEN (L.-M.-G.), DEVOS (A.), STAELENS (M.) et VIANE (N.). — Etude de souches polonaises de mycobactéries anonymes d'origine humaine. Communication Ecole Med. Vet. Université de l'Etat à Gand, 1963, 7, n° 1, 5-18.
- (121) GORDON (M.-E.) et SMITH (M.-M.). — Rapidly growing acid-fast bacteria : Species' description of « *Mycobacterium phlei* » Lehmann and Newmann and « *Mycobacterium smegmatis* » (Trevisan) Lehmann and Newmann. *J. Bact.*, 1953, 66, 41-48.
- (122) GREEN (H.-H.). — Weybridge P.P.D. Tuberculin. *Vet. J.*, 1946, 102, 267.
- (123) GREENBERG (A.-E.) et KUPKA (E.). — Swimming pool injuries, mycobacteria and tuberculosis like disease. *Publ. Hlth. Rep.* (Wash), 1957, 72, 902-904.
- (124) GUTIEREZ-VASQUEZ (J.-M.). — Further studies on the spot test for the differentiation of tubercle bacilli of human horizon from other mycobacteria. *Amer. Rev. Tub.*, 1960, 81, 412.
- (125) GUY (L.-R.) et CHAPMANN (J.-S.). — Susceptibility « in vitro » of unclassified mycobacteria to commonly used antimicrobials. *Amer. Rev. Respir. Dis.*, 1961, 84, 746.
- (126) HAGAN (W.-A.) et LÉVINE (P.). — The pathogenicity of the saprophytic acid-fast bacilli. *Amer. Veter. Assoc.*, 1932, 81, 723-733.
- (127) HAGAN (W.-A.). — *Cornell Vet.*, 1929, 19, 173.
- (128) HARDY (A.-V.), DUNBAR (F.-P.), JEFFERIES (M.-B.), BOND (J.-O) et LEWIS (A.-G.). — Bacteriological and epidemiological studies of pulmonary disease associated with atypical acid-fast bacilli. *Amer. J. Publ. Hlth.*, 1958, 48, 754-759.
- (129) HARTWIG (E.-C.-J.). — Observation on the pigment production of unclassified mycobacteria under conditions of incubation in the light and in the dark. *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 1960, 81, 925-928.

- (130) HASTING (E.-G.), BEACH (B.A) et THOMPSON (I.). — The sensitization of cattle to tuberculin by other than tubercle bacilli. *Amer. Rev. Tuberc.*, 1930, 22, 218.
- (131) HAUDUROY (P.) et ROSSET (W.). — Un bactériophage lysant certaines mycobactéries. *C.R. Acad. Sci.*, 1948, 227, 917.
- (132) HAUDUROY (P.) et PASTERNAK. — *C.R. Acad. Sci.*, 1949, 228, 781.
- (133) HAUDUROY (P.). — L'acido-alcool-résistance des bacilles tuberculeux et paratuberculeux. *Bull. de l'OMS*, 1949, II, 337.
- (134) — Derniers aspects du monde des Mycobactéries. 1955, Masson éd., Paris.
- (135) — Un nouveau groupe de Mycobactéries « les Mycobactéries anormales ». *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, 1955, 89, 673.
- (136) HAUDUROY (P.) et PIGUET (J.-D.). — Sur la « structure en cordes » des mycobactéries. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, 1957, 92, 547-548.
- (137) HAUDUROY (P.). — Essai sur la classification des mycobactéries. Institut de Méd. Tropic. Prince Léopold (Anvers) 1^{er} Colloque International sur les Mycobactéries, 1959, p. 36.
- (138) — L'hétérogénéité possible des populations bactériennes. *Rev. d'Immunol.*, 1959, 28, 54.
- (139) — Des Mycobactéries anormales et de leurs rapports avec la pathologie humaine. *Rev. d'Immunol.*, 1960, 24, 606.
- (140) — Des mélanges de germes et de l'hétérogénéité possible des souches bactériennes. *Presse Médicale*, 1960, 68, 2282.
- (141) — De l'importance en clinique et au laboratoire de certaines mycobactéries « anormales ». *Presse Médicale*, 1955, 63, 1319.
- (142) — Bacilles tuberculeux-paratuberculeux et Mycobactéries anormales. *Presse Médicale*, 1961, n° 43, 69, 1837.
- (143) HAUDUROY (P.) et TANNER (F.). — A propos de l'isolement à partir de la terre des bactériophages actifs contre les mycobactéries. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, 1963, 104, 326-829.
- (144) HAUDUROY (P.). — A propos des Mycobactéries dites atypiques. *Bull. Acad. Nation. Med.*, 1963, 147, 105-109.
- (145) — Inventaire et description des bacilles paratuberculeux. Masson éd., Paris, 1946.
- (146) HAUDUROY (P.), GASCHEN (H.) et ROSSET (W.). — Recherche des bacilles tuberculeux dans les organes des animaux sains. *C.R. Soc. Biol.*, 1946, 140, 239.
- (147) HEMMERT-HALSWICK et PESCATORE. — *Experim. Vet. Med.*, 1950, 2, 1-40.

- (148) HIRANO (N.) et SUSHIDA (K). — Serological relationship between mycobacteria as determined by agar diffusion precipitation test. *Jap. P. Microbiol.*, 1961, 4, 303-325 (abstract).
- (149) HUYGELEN (C.), TIENLOWI (D.) et WANDERVELDEN (M.). — *Nature* (Londres), 1960, 186, 979.
- (150) JANSSENS (P.-G.), QUERTINMONT (M.-J.), SIENIAWSKI (J.) et GATTI (F.). — Necrotische tropenzweer en nieuwe mycobakteriele verwekkens. *Verh. Kon. Acad. Geneesk. Belg.*, 1958, 20, 420.
- (151) JENSEN (K.-A.) et KIAERT (I.). — Technique simplifiée de classification des Mycobactéries. *Bull. Un. Int. Tuberc.*, 1958, 28, 165-168
- (152) JOHNSON (H.-W), LARSEN (A.B.), HENLEY (R.-R.) et GRAITH (A.-M.). — Studies on johnin. VI : The relationship of the allergens of *M. paratuberculosis*, *M. tuberculosis* var. *avium*, *bovis* and *hominis*, and *M. phlei*. *Amer. J. Vet. Res.*, 1949, 10, 138.
- (153) JOUBERT (L.), FERNEY (J.), OUDAR (J.) et VAN HAVERBEKE (G.). — Thélite nodulaire de la vache laitière à mycobactéries atypiques scotochromogènes. *Rev. Med. Vét.*, 1963, 114, 87.
- (154) JOUBERT (L.) et VALETTE (L.). — Les virus vaccino-varioliques des animaux. Symposium Intern. sur la Variole, Lyon, nov. 1963.
- (155) JUHLIN (I.). — Methods for the grouping and typing of Mycobacteria. 1. Differentiation of mycobacteria into « *M. tuberculosis* » and anonymous mycobacteria. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 1960, 50, 195-207.
- (156) JUHLIN (I.). — 3. Differentiation of anonymous mycobacteria into groups, subgroups and types. *Ibid.*, 1960, 50, 195-207.
- (157) KAPLAN (M.), GRUMBACH (R.) et DOBROWOLSKI (B.). — Adénites cervicales à bacilles paratuberculeux (bacilles a.a.r. chromogènes) chez l'enfant. *Presse Médicale*, 1958, 66, 1905-1908.
- (158) KARLSON (A.-G.), DAVIS (C.-L.) et COHN (M.-L.). — Une souche scotochromogène de *Mycobacterium avium* d'un cygne. *Amer. J. Vet. Res.*, 1962, 23, 575-579.
- (159) KEITH (H.M.) et WEED (L.-A.). — Non tuberculous acid-fast bacilli in cervical adenitis. *J. of Dis. of Child.*, 1956, 92, 506.
- (160) KENDING (E.-L.). — Unclassified Mycobacteria in children. Correlation of skin tests and gastric cultures. *Amer. J. Dis. Child.*, 1961, 101, 749-755.

- (161) KLUGH (G.-A.) et PRATT (P.-C.). — Experimental immunization of guineapigs with photochromogenic acid-fast bacilli. *Amer. Rev. Respir. Dis.*, 1962, 85, 78-83.
- (162) KOCH (M.-L.), DAIGNEAULT (J.-W.) et GEHRKE (J.-W.). — Distinguishing « *M. tuberculosis* » from other slow-growing mycobacteria by modifications of the niacin test. *Amer. Rev. Respir. Dis.*, 1961, 84, 750-751.
- (163) KÖLBEL (H.). — Elektronenoptischen Nachweis der lipolytischen Aktivität von Mycobakterien. Proc. Eur. Rég. Conf. Elect. Micro. Dleft, 1960, 2, 730-733 (résumé : *Bull. Inst. Pasteur*, 1963, n°).
- (164) KONNO (K.). — New chemical method to differentiate human type tubercle bacilli from other Mycobacteria. *Science*, 1956, 124, 985.
- (165) — Reability of the niacin test. *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 1960, 82, 422.
- (166) KONNO (K.) et SBARRA (A.-J.). — Differentiation of human tubercle bacilli from atypical acid-fast bacilli. III : Modification of the niacin test using Tween-Albumin liquid medium. *Amer. Rev. Tuberc.*, 1959, 79, 810-812.
- (167) KOVACS (N.). — Nicht-Klassifizierte Mycobacterium. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.*, 1962, 184, 46-57.
- (168) KOZUKI (K.), NAKAMURA (A.), KONDO (Y.) et OYAMADA (K.). — Studies on a patient treated under the diagnosis of pulmonary tuberculosis and expectorating a strain of chromogenic mycobacterium for a long time and on the characters of the mycobacterium isolated. *Kakkaku.*, 1960, 35, 728.
- (169) KREIS (B.) et LE JOUBIAU (E.). — Dissociation par l'eau oxygénée des souches isoniazido-résistantes des bacilles tuberculeux. *Ann. Inst. Pasteur* (Paris), 1957, 92, 123.
- (170) KUBICA (G.-B.) et VESTAL (A.L.). — The arylsulfatase activity of acid-fast bacilli. I : Investigation of activity of stock cultures of acid-fast bacilli. *Amer. Rev. Respir. Dis.*, 1961, 83, 728-732.
- (171) KUBICA (G.-B.) et BEAM (R.-E.). — II. The differentiation of « *Mycobacterium avium* » from the unclassified group III non photochromogenic mycobacteria., *Ibid.*, p. 733-736.
- (172) KUBICA (G.-B.) et RIGDON (A.-L.). — III. Preliminary investigation of rapidly growing acid-fast bacilli. *Ibid.*, p. 737-740.
- (173) KUSHNER (D.-S.), Mc MILLEN (S.) et SENDERI (M.). — Atypical acid-fast bacilli. II « *Mycobacterium fortuitum* ». Bacteriologic characteristics and pathogenicity for laboratory animals. *Amer. Rev. Tuberc.*, 1957, 76, 108-122.

- (174) LAPORTE (R.). — Contribution à l'étude des bacilles paratuberculeux. I. Propriétés pathogènes. *Ann. Inst. Pasteur* (Paris, 65, 282-325.
- (175) LAGERCRANTZ (R.). — Immunological studies for mycobacteria. I. The ability of various bacteria and fungi to induce production of antibody against erythrocyte — adsorbable antigens from the tubercle bacillus. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 1956, 38, 416-432.
- (176) LANYI (M.). — The isolation of chromogene mycobacteria from laryngeal cultures. *J. Clin. Path.*, 1958, 11, 69-70.
- (177) LEACH (R.-H.) et FENNER (F.). — Studies on *Mycobacterium ulcerans* and *balnei*. *Aust. J. of Exp. Biol.*, 1954, 32, 835.
- (178) LESSLIE (I.-W.). — Purified protein derivatives prepared from non tuberculosis mycobacteria including « *M. Johnei* ». Institut de Méd. Tropicale Prince Léopold (Anvers). 1^{er} Colloque Intern. sur les Mycobactéries (1959).
- (179) LEVADITI (C.), VAISMAN (A.) et LÉVY (P.). — Certaines souches de bacilles paratuberculeux réputées non virulentes le sont-elles réellement ? *Presse Médicale*, 1949, 57, 852.
- (180) — Virulence du « *Mycobacterium smegmatis* ». *C. R. Acad. Sci.*, 1949, 229, 263-264.
- (181) LÉVY (P.-P.). — Action des Eubactéries aérobies et des Corynébactéries sur le virage globulaire. *C.R. Soc. Biol.*, 1949, 143, 1465.
- (182) — Action du bacille de Koch et des bacilles paratuberculeux sur le virage globulaire. *C.R. Soc. Biol.*, 1950, 144, 1468.
- (183) LEWIS (A.-G.), DUNBAR (F.-P.) et LASCHE (E.-M.). — Chronic pulmonary disease due to atypical mycobacterial infections. *Amer. Rev. Resp. Dis.*
- (184) LIND (A.). — Serological studies of mycobacteria by means of diffusion in gel techniques. I. Preliminary investigations. *Inst. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 1959, 14, 264.
- (185) — IV. The precipitinogenic relationships between different species of mycobacteria with special reference to « *Mycobacterium tuberculosis* », « *M. phlei* », « *M. smegmatis* » and « *M. avium* ». *Ibid.*, 1960, 17, 300-322.
- (186) LINELL (F.) et NORDEN (H.). — *Mycobacterium balnei*. *Acta Tuberc. Scand.*, 1954, 33, 184.
- (187) LINZ (R.) et LECOQ (E.). — La sensibilité in vitro de *M. tuberculosis* à l'hydrazide de l'acide nicotinique. *C.R. Soc. Biol.*, 1952, 146, 1444.
- (188) LUTZ (A.). — Sur la recherche de l'action de l'acide p-amino-salicylique sur quelques souches de bacilles paratuberculeux. *C.R. Soc. Biol.* 1948, 142, 1404-1405.

- (189) — Différenciation des bacilles tuberculeux et paratuberculeux par la thiosemicarbazone de la paracétylamino-benzaldéhyde. *C.R. Soc. Biol.*, 1950, 144, 1211-1213.
- (190) MAC CALLUM (P.), TOLHURST (J.-C.), BUCKLE (B) et SISSONS (H.-A.). — A new mycobacterial infection in man. *J. Path. Bact.*, 1948, 60, 93.
- (191) MAC GALLUM (J.). — Application des réactions de Dubos-Middlebrook et de Desbordes à « *Mycobacterium ulcerans* ». *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, 1954, 87, 97-99.
- (192) MAC MILLEN (S.) et KUSHNER (D.-S.). — Atypical acid-fast bacilli. I. Cultural scheme for rapid identification. *Amer. Rev. Tuberc.*, 1957, 76, 103-107.
- (193) — Atypical acid-fast bacilli. *Amer. Rev. Respir. Dis.*, 1959, 80, 434-437.
- (194) MAGNUSSON (M.). — Comparative intradermal reactions of tuberculosis patients to purified tuberculosis (P.P.D.) and purified sensitin prepared from *Mycobacterium Kansaii*. *Acta Tuberc. Scand.*, 1961, 40, 85-102.
- (195) MAGNUSSON (M.). — Specificity of mycobacterial sensitins. I. Studies in guinea pigs with purified « tuberculin » prepared from mammalian and avian tubercle bacilli, « *Mycobacterium balnei* », and other acid-fast bacilli. II. Studies in guinea pigs with purified Sensitin prepared from unclassified acid-fast bacilli. *Amer. Rev. Respir. Dis.*, 1961, 83, 57-68.
- (196) MANDLER (F.), GANZETTI (G.-L.) et GRASSI (F.). — Criteri di determinazione del contenuto in acido nicotinico dei micobatteri. Nota di tecnica. *G. Ital. Tuberc.*, 1960, 14, 321-325.
- (197) MANDLER (F.). — Caratteristiche differenziali ed aspetti morfologici dei micobatteri « atipici ». *Atti Soc. Lombarda Sci. Med. Biol.*, 1959, 14, 54-56.
- (198) MANKIEWICZ (E.). — Agar diffusion precipitation and complement fixation tests applied to the study of the antigenic relationship between chromogenic acid-fast bacteria and *M. tuberculosis*. *Canad. J. Microbiol.*, 1958, 4, 565-570.
- (199) MANNINGER et MOCZY. — Traité des maladies internes des animaux. p. 250-251 et 318.
- (200) MANTEN (A.). — Antimicrobial susceptibility and some other properties of photochromogenic mycobacterium associated with pulmonary disease. *Ant. Van Leeuw Wenhock.*, 1957, 23, 357-363.
- (201) MARKS (J.). — Infective pneumoconiosis due to anonymous mycobacteria. *Brit. Med. J.*, 1961, 1332.

- (202) MARSDEN (H.-B.) et HYDE (W.-A.). — Anonymous mycobacteria in cervical adenitis. *Lancet*, 1962, 1, 249-250.
- (203) MATĚJKA (M.) et MEZENSKY (L.). — Comparative study of various micro-methods for niacin contents estimation in mycobacterial cultures for routine laboratory investigation. *Rozkledy v Tuberk.* (résumé en anglais), 1961, 21-5, 403-406.
- (204) MEDWECZKY (E.). — A micromethod for the routine differentiation of human tubercle bacilli from other mycobacteria in primary cultures. *Amer. Rev. Tub.*, 1960, 81, 757.
- (205) MEISSNER (G.). — Détection des bacilles « atypiques » et des saprophytes par les caractères des cultures et la résistance aux médicaments. *Bull. Un. Int. Tuberc.*, 1958, 28, 160-162.
- (206) — Untersuchungen an typischen Mycobakterien. I. Vergleichende bakteriologische Untersuchungen zu ihrer Erkennung und Gruppeneinteilung. *Betr. Klin. Tuberk.*, 1959, 120, 377-387.
- (207) MIDDLEBROOK (G.). — Isoniazido-résistance and catalase activity of tubercle bacilli. *Amer. Rev. Tub.*, 1954, 69, 471-472.
- (208) MUTFIC (M.) et MARCOVICI (I.). — Sur la valeur de l'amidasegramme pour l'identification des Mycobactéries appelées « *Mycobacterium aquae* ». *Ann. Inst. Pasteur* (Paris), 1964, 106, 138.
- (209) NAGAYAMA (H.), KONNO (K.) et OKA (P.). — Formamidase in mycobacteria and its use in differentiating saprophytic mycobacteria from other mycobacteria. *Nature* (London) 1961, 190, 1219-1220.
- (210) NAKAYAMA (Y.) et TAKEYA (K.). — A simple heat-stable esterase test for the classification of mycobacteria. *Nature* (London), 1963, 198, 113-114.
- (211) NASSAU (E.) et HAMILTON (G.-M.). — Atypical mycobacteria in human pulmonary disease. *Tubercle Lond.*, 1957, 38, 387-396.
- (212) NÈGRE (L.), VALTIS (J.) et LABERNADIE (V.). — Bacilles paratuberculeux isolés des expectorations d'un malade atteint de lésions pulmonaires. *C. R. Soc. Biol.* 1931, 107, 1054-1055.
- (213) NORDEN et LINELL. — *Nature*, 1951, 168, 826.
- (214) NORDEN (A.). — Bacteriology and epidemiology of *Mycobacterium balnei*.
- (215) NOUFFLARD (H.), COSTIL (L.), BRISSAUD (H.-E.), GERBEAUX (J.), ROUCHON (M.). — Adénites cervicofaciales de l'enfant à bacilles paratuberculeux (chromogènes atypiques). *Rev. Tuberc. (Paris)*, 1961, 25, 620-641.

- (216) OBAJSKA (K.). — Phosphomonoesterases in acid-fast mycobacteria. *Acta Microbiol. Polon.* 1961, 9, 315-319.
- (217) OGAWA (T.) et OOTANI (N.). — Niacin test for differentiation of « *Mycobacterium tuberculosis* » var. « *hominis* » from other acid-fast bacilli. I. Relation between the number of colonies, growth rate of « *Mycobacterium tuberculosis* » var. « *hominis* » and the results to niacin test. *Kekkaku*, 1962, 37, 184-187.
- (218) — II. Its relation to drug sensitivity and comparison of cyanogen bromide-aniline method with cyonogen bromide-benzidine method. *Ibid.* 37, 217-221.
- (219) OLSON (H.-O.) et RIEMENSNIJDER (O.-K.). — Studies on non tuberculosis acid-fast bacilli recovered from human sources : Penicillin susceptibility. *Amer. Rev. Tub.* 1957, 75, 675-677.
- (220) OPHÜLS (W.). — *J. of M. Research*, 1904, 11, 439.
- (221) PALLASKE (G.). — Histologie pathologique. 1 vol. 355 p., Vigot frères, édit., Paris, 1957.
- (222) PANISSET (L.). — Traité des maladies infectieuses des animaux domestiques. 1 vol. 562 p., Vigot frères, édit., Paris, 1938.
- (223) PARISOT (T.-J.) et DECKER (A.-M.). — A comparative study of the causative agent of a mycobacterial disease of salmonoid fishes. — I : A comparison of the staining characteristics of the fish disease with human tuberculosis in sections stained by the Fite-Faraco and Ziehl-Nielsen methods. *Amer. Rev. Respir. Dis.* 1960, 81, 60-67.
- (224) PATERSON (A.-B.). — The incidence and causes of tuberculin reactions in non tuberculous cattle. *Progrès de l'exploration de la Tuberculose*, 1956, 7, 101-129.
- (225) PARLETT (R.-C.) et YOUMANS (G.-P.). — Antigenic relationships between ninety-eight strains of mycobacteria using diffusion precipitation techniques. *Amer. Rev. Tuberc.* 1958, 77, 450-461.
Thèse Doct. Vét., Lyon, 1957.
- (226) PARLETT (R.) et YOUMANS (G.-P.). — Antigenic relationships between Mycobacteria as determined by agar diffusion precipitating techniques. *Amer. Rev. Tub.* 1956, 73, 637-647.
- (227) PATNODE (R.-A.), WRINCKE (C.-K.) et BEASLEY (C.). — Evaluation of the oxydation-reduction dye test for the determination of virulence of mycobacteria in vitro. *Amer. Rev. Tub.* 1954, 69, 599-603.

- (228) PENSO (G.). — Les bacilles paratuberculeux. *Bull. de l'O. M. S.*, 1949, 2, 332.
- (229) — Identification des mycobactéries à la lumière de leur constitution antigénique. Inst. de Méd. Trop. Prince Léopold (Anvers). Colloque Intern. sur les Mycobactéries, 1959, 52-70.
- (230) PENSO (G.), CASTELNUOVO (G.), GAUDIANO (A.), PRINCIVALLE (L.), VELLA (L.) et ZAMPIERI (A.). — *R. C. Ist. Sup. San.*, 1952, 15, 491-548.
- (231) PÉRARD (C.) et RAMON (H.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1913, 74, 133.
- (232) PERCHINE (G.-N.) et ZIKOVA (T.-N.). — L'indophénol oxydase du saprophyte acido-résistant B 5. *Probl. Tuberk.* (résumé en Français), 1959, 37, n° 7, 74-76.
- (233) POLENSKA (E.), URBANCIK (R.) et Collab. — Expérience gagnée par l'emploi de l'épreuve à la niacine pour le diagnostic différentiel des diverses mycobactéries. *Probl. Tuberk* (en russe, résumé en Français), 1962, 40, n° 2, 93-96.
- (234) POLLAK (A.). — The antibiotic sensitivity of « *Mycobacterium kansasii* ». *Antibiot. Annual* 1956-1957, 494-512.
- (235) POLLAK (A.) et BUHLER. — *Amer. J. Clin. Path.*, 1953, 23, 363.
- (236) POPPER (M.) et LOREAN (M.-V.). — Pneumopathies à bacilles acido-résistants anormaux. *Presse Médicale*, 1958, 66, 1277.
- (237) PRÉVOT (A.-R.). — Traité de systématique bactérienne. Dunod, édit., Paris, 1961.
- (238) PRIGNOT (J.) et VAN DE WOORDE (H.). — Mycobactéries atypiques chromogènes et pneumoconioses des houilleurs. *Acta Tuberculosea Belgica*, 1958, 192-207.
- (239) PRISSICK (F.-H.) et MASSON (A.-M.). — Cervical lymphadenitis in children caused by chromogenic bacteria. *Canadian Med. Assoc. J.*, 1956, 75, 798-803.
- (240) RABYI (A.) et ENTESSAR (F.). — La paratuberculose des chèvres. *O.I.E.*, juillet-août 1946, 55.
- (241) RAYNAUD (P.). — Contribution à l'étude de Mycobactéries.
- (242) RICE (C.-E.), KONST (H.) et CARRIÈRE (J.). — La maladie de Johne au Canada. Une réaction de fixation du complément plus sensible. *Canadian J. of Comp. Med. and Vét. Sc.*, 1961, 25, 121-128.
- (243) RIST (N.). — Le rôle du laboratoire dans la lutte antituberculeuse. *Maroc Médical*, 1963, 42, 403.

- (244) RIST (N.). — Lésions ganglionnaires et pulmonaires produites chez le cobaye par inoculation de bacilles paratuberculeux morts enrobés dans de la paraffine ou l'huile de vaseline. *C.R. Soc. Biol.*, 1937, 126, 185.
- (245) ROBERTSON (A.) et HOLE (N.-H.). — *Journ. Comp. Path. e Ther.*, 1937, 50, 39.
- (246) ROGUL (M.), KELLER (R.) et CABELLI (V.-J.). — The classification and susceptibility to chemotherapeutic agents of chromogenic acid-fast bacilli. *Amer. Rev. Tuberc.*, 1957, 76, 697-702.
- (247) ROMAGNOLI (A.). — Sulle cosiddette « skin lesions ». *Zooprofilassi*, 1958, 11 novembre.
- (248) RUNYON (E.-H.). — The recognition and characterization of pulmonary mycobacterial pathogen other than tubercle bacilli : a review. *Bull. Un. Intern. contre la Tuberculose*, 1959, 29, 396-410.
- (249) — Différenciation des mycobactéries anonymes (atypiques) et des bacilles tuberculeux des Mammifères. *Bull. Un. Int. Tuberc.*, 1959, 29, 72-82.
- (250) RUNYON (E.-H.), SÉLIN (M.) et HARRIS (H.-W.-M.). — Distinguishing Mycobacteria by the niacin test. *Amer. Rev. Respir. Dis.*, 1959, 79, 663-665.
- (251) SANSONNENS (R.). — Le pouvoir pathogène naturel et expérimental des bacilles paratuberculeux. *Thèse de Lausanne*, 1946.
- (252) SATO (K) et SATAKE (O.). — Studies on catalase activity of acid-fast bacilli, especially of atypical acid-fast bacilli. *Kekkaku* (résumé), 1961, 36, 785-789.
- (253) SAVOY (N.) et BELCHEV (D.). — Tuberculin reactions in calves experimentally infected with different types of mycobacteria. *Izv. Vet. Inst. Zazaz. Parasit. Bolesti Sora*, 1961, 1, 251-258 (abstract).
- (254) SCAMMON (L.-A.), PICKETT (M.-S.), FROMAN (S.) et WILL (O.-W.). — Non chromogenic acid-fast bacilli isolated from tuberculous swine. Their relation to *M. avium* and the « Battey » type of unclassified mycobacteria. *Amer. Rev. Respir. Dis.*, 1963, 87, 97-102.
- (255) SCHAEFFER (W.-B.) et DAVIS (C.-L.). — A bacteriologic and histopathologic study of skin granuloma due to « *Mycobacterium balnei* ». *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 1961, 84, 837-844.
- (256) SCHEPERS (G.-W.-H.), SMART (R.-H.), SMITH (C.-R.), DWORSKI (M.) et DELAHAUT (A.). — Fatal silicosis with complicating infection by an atypical acid-fast photochromogenic bacillus. *Indust. Med. Surg.*, 1958, 27, 27-36.

- (257) SCHMIDT (L.-H.), HOFFMAN (N.-R.) et STEENKEN (W.). — *Amer. Rev. Tub.*, 1957, 75, 169.
- (258) SEELEMAN (M.) et RACHOW (H.-G.). — Zur Allergie bei Infektionen mit verschiedenen Mykobakterien. *Reisidentuberkulose*, 1955, 4, 153-171.
- (259) SEGAWA (J.), TAKEYA (K.) et SASAKI (M.). — Isolation of lysogenic acid-fast bacilli from the soil. *Amer. Rev. Respir. Dis.*, 1960, 81, 419-420.
- (260) SELKON (J.-B.) et MITCHISON (D.-A.). — A typical mycobacteria and drug resistant tubercle bacilli isolated during a survey of untreated patients with pulmonary tuberculosis. *Tubercle* (London), 1959, 40, 141-154.
- (261) SHEPART (C.-C.). — Growth characteristics of tubercle bacilli and certain other mycobacteria in Hela cells. *J. Exp. Med.*, 1957, 105, 39-48.
- (262) SHEPART (C.-C.) et KIRSH (D.). — Fluorescent antibody and other consequences of the disruption of mycobacteria. *Proc. Soc. Exp. Biol.* (N.Y.), 1961, 106, 685-9.
- (263) DEL SINDAGO (G.). — Aspetti morfologici del « *Mycobacterium phlei* » nelle successive fasi di sviluppo osservati in micro culture per striscio. *Nuov. Ann. Ig. Microbiol.*, 1956, 7, 407-410.
- (264) SINGER (J.) et CYSNER (E.). — Urease activity in Mycobacteriaceae. *Amer. Rev. Tub.*, 1952, 62, 779-782.
- (265) SMITH (M.-M.) et STEENKEN (W.). — Group differentiation of mycobacteria on thioglycollate medium. *Amer. Rev. Respir. Dis.*, 1961, 84, 447-450.
- (266) SŒUR MARIE-SUZANNE et PENSO (C.). — Sulla identità specifica del cosiddetto « ceppo chauvire » : *Mycobacterium marianum* n. sp.
- (267) STEENKEN (W.), SMITH (N.-M.) et MONTALBUN (V.). — In vitro and in vivo effect of antimicrobial agents on atypical mycobacteria. *Am. Rev. Tuberc.*, 1958, 78, 454-461.
- (268) STUART (P.) et MARSHALL (F.-M.). — *Vet. Rec.*, 1952, 64, 309.
- (269) STUART (P.) et HARVEY (P.). — Bovine mastitis resembling tuberculous caused by *Mycobacterium lacticola* and other rapidly growing acid-fast bacteria. *Vet. Rec.*, 1951, 63, 881 (abstract in *Vet. Bull.*, 1953, 23, 342)
- (270) SZABO (I.). — Les Mycobactéries saprophytes. Importance épidémiologique. *Revue d'Immunol.* (Paris), 1963, 27, 97-104.
- (271) SZABO. — Classification des Mycobactéries saprophytes. *Rev. Imm. Paris*, 1963, 25, 372-378.

- (272) TACQUET (A.) et TISON (F.). — Activité « in vitro » et « in vivo » du dextro-2-2'-(éthylène-diimino) di-1-butanol, utilisé seul ou en association sur les mycobactéries « atypiques ». *Soc. Franç. de la Tuberculose*, 11 mai 1963.
- (273) TACQUET (A.), TISON (F.) et DEVULDER (B.). — Action bactéricide du yaourt sur les mycobactéries. *Ann. Inst. Pasteur* (Paris., 1961, 100, 581.
- (274) TAKEYA (K.), AMAKO (K.) et MATSUMURA (T.). — Pathogenicity of the non photochromogenic strains of unclassified mycobacteria isolated from dogs for mice and dogs. *Kekkaku*, 1962, 37, 135-140.
- (275) TAKEYA (K.), ZINNAKA (Y.), YAMURA (K.), et TODA (T.). — Bacteriophage susceptibility and Tuberculin specificity of unclassified mycobacteria. *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 1960, 81, 674-682.
- (276) TARSHIS (M.-S.), WEED (W.-A.), PARKER (M.-V.) et DUNHAM (W.-B.). — Chromogenic acid-fast bacilli from human sources. - IV. In vitro, response to a number of Antimicrobial agents on glycerol Blood Agar medium. *Amer. Rev. Tub.* 1955, 72, 119-122.
- (277) TARSHIS (M.-J.) et FRISCH (A.-W.). — Chromogenic acid fast bacilli from pulmon sources. *Am. Rev. Tub.* 1952, 65, 279-315.
- (278) TARSHIS (M.-S.). — Further investigation on the selective activity of fluid thioglycollate medium for group differentiation of « *M. tuberculosis* », anonymous (atypical) acid-fast bacilli, and saprophytic mycobacteria. *J. Lab. Clin. Med.*, 1959, 54, 630-633.
- (279) — A comparative study of the aniline-cyanogen bromid and o-toluidine-cyanogen bromid direct qualitative miceoniacin tests for differentiating human tubercle bacilli from other mycobacteria. I. : Results obtained using fresh cultures. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 1960, 82, 733-735.
- (280) — *Ibid.* II. : Results obtained using stored cultures of varying ages. *Acta Tuberc. Pneumol. Scand.* 1961, 41, 47.
- (281) — The preservation of mycobacterie by freezing in various diluents. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 1961, 83, 762-766.
- (282) — Further investigation on the usefulness of the niacin test for differentiating human tubercle bacilli from other mycobacteria. - II. : comparative study of three direct qualitative micro-methods using stored cultures of varying ages. *Tubercles* (London), 1961, 42, 101-106.

- (283) — A combined Neutral Red, serpentine cord, and differential growth test for distinguishing human and bovine tubercle bacilli from other mycobacteria. *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 1962, 86, 749-754.
- (284) TIMPE (A.) et RUNYON (E.-H.). — The relationship of « atypical » acid-fast bacteria to human disease. A preliminary report. *J. Lab. Clin. Med.*, 44, 202-209 (summary).
- (285) TIRUNARA YANAN (M.) et VISCHER (W.-A.). — Relationship of isoniazid to the metabolism of mycobacteria. *Amer. Rev. Tub.*, 1957, 75, 62.
- (286) TODA (T.), HAGIHARA (Y.) et TAKEYA (K.). — A simple urease test for the classification of mycobacteria. *Amer. Rev. Respir. Dis.*, 1961, 83, 757-761.
- (287) TOLHURST (J.-C.). — The effect of the medium on the cultivation of « *Mycobacterium balnei* » at 37°C. *J. Gen. Microbiol.*, 1958, 18, 295-301.
- (288) TOLHURST (J.-C.), BUCKLE (G.) et WELLINGTON (N.-A.-M.). — The experimental infection of calves with « *Mycobacterium ulcerans* ». *J. Hyg. (Lond.)*, 1959, 57, 47-56.
- (289) TRAUM (J.). — *J.A.V.M.A.*, 1916, 49, 254.
- (290) TSUKAMURA (M.). — Enzymatic reduction of picric acid by mycobacteria. *Amer. Rev. Respir. Dis.*, 1961, 84, 87-89.
- (291) TUCKER (E.-W.). — Infection of the bovine udder with *Mycobacterium* species. *Corn. Vet.*, 1953, 43, 576.
- (292) UREANCİK (R.). — Chemotherapy of diseases caused by atypical mycobacteria. I : « In vitro » response to a number of antimicrobial agents in blood agar, 7 Hg and Loewenstein media. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.*, 1959, 3, 306-313.
- (293) USHIBA (D.), OZAWA (A.), NAKAYAMA (S.) et UJI-IBE (A.). — Pathogenicity of atypical mycobacteria for guinea pigs and mice. *Kekkaku*, 1961, 36, 689-693.
- (294) UYEDA (S.) et ITO (Y.). — Deux souches de mycobacteriophages récemment isolés et leur action sur des microcolonies d'une Mycobactérie saprophyte. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, 1961, 100, 681.
- (295) VANDRA (E.) et GAL (F.). — Isolation of phages active against mycobacteria. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. (Budapest)*, 1958, 5, 43-48.
- (297) VANORDEN (L.-S.) et KIRCHHEIMER (W.-P.). — The effect of streptomycin on *Mycobacterium smegmatis* growing in the presence of putrescine or ammonium sulfate. *Amer. Rev. Tub.*, 1955, 71, 743-751.

- (298) VERGE (J.), BUCK (G.), DRIEUX (H.) et FLORENCE (G.). — Le granulome de Roëckl chez le Zèbre. *Rec. Med. Vet.*, 1939, 119, 257.
- (299) VERGE (J.), TACHON (L.) et DRIEUX (H.). — Contribution à l'étude des lésions nodulaires du muscle chez les bovidés. Le granulome de Roëckl. *Rec. Med. Vet.*, 1937, 113, 129-144.
- (300) VIALIER (J.) et BERTOYE (A.). — L'isolement des Mycobactéries non pathogènes par la culture de l'expectoration, source d'erreurs diagnostiques et thérapeutiques. *J. Méd. Lyon*, 1957, 773-780.
- (301) — Mélange de Mycobactéries dans certains produits pathologiques ; intérêt de leur séparation. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, 1957, 86, 376.
- (302) VIALIER (J.), CAYRE (R.-M.) et AUGAGNEUR (J.). — Les « Mycobactéries atypiques » pathogènes pour l'homme. *Ann. Biol. Clin.*, 1962, 20, 3-14.
- (303) VIALIER (J.) et DESPIERRES (G.). — Les Mycobactéries atypiques. Leur activité pathogène chez l'homme. *Lyon Méd.*, 1962, 128, 199-208.
- (304) VIALIER (J.). — Isolement des Mycobactéries non pathogènes par culture de l'expectoration des tuberculeux pulmonaires. Leurs caractères distinctifs. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, 1954, 87, 732.
- (305) VIALIER (J.) et CAYRE (R.-M.). — Sur les caractères antigéniques des Mycobactéries non pathogènes. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 1959, 153, 1031-1033.
- (306) VIALIER (J.), DESPIERRES (G.) et CAYRE (R.-M.). — Existe-t-il des affections pulmonaires humaines dues à des mycobactéries atypiques non pathogènes pour l'animal ? *Presse Médicale*, 1959, 67, 1508-1510.
- (307) VIALIER (J.) et LANERY (R.). — Sur l'activité catalasique des Mycobactéries. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 1960, 154, 2307-2308.
- (308) VIALIER (J.) et AUGAGNEUR (J.). — Intérêt de la recherche de l'hydrolyse de l'urée dans l'identification des mycobactéries. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 1961, 155, 1300-1301.
- (309) — Renseignements fournis par l'utilisation systématique du test à la niacine dans l'identification des mycobactéries isolées de produits pathologiques. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 1961, 155, 1641-1642.
- (310) VIALIER (J.), AUGAGNEUR (J.) et LANERY (R.). — Valeur du test de la réduction des nitrates pour l'identification des mycobactéries. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 1961, 155, 2380-2382.
- (311) VIALIER (J.) et AUGAGNEUR (J.). — Test de la niacine et identification des mycobactéries (valeur de la méthode). *Rev. Franç. Et. Clin. Biol.*, 1961, 6, 500-503.

- (312) VIALLIER (J.), AUGAGNEUR (J.) et LANERY (R.). — Identification biochimique des mycobactéries. *Bull. Soc. Sci. Vét. Lyon*, 1962, 64, 327-331.
- (313) VIALLIER (J.), CAYRE (R.-M.) et AUGAGNEUR (J.). — Sensibilité des mycobactéries atypiques aux différents antibiotiques. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 1959, 153, 111-113.
- (314) VIALLIER (J.), CAYRE (R.-M.) et LANERY (R.). — Activité bactériostatique exercée « in vitro » sur les mycobactéries par le 4-4'-diisoamyloxy-thiocarbanilide. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 1962, 156, 854-856.
- (315) VIALLIER (J.), KALB (J.-C.) et TIGAUD. — Sur la coloration par le rouge neutre du bacille tuberculeux. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 1950, 144, 1513.
- (316) VIALLIER (J.), CAYRE (R.-M.) et LANERY (R.). — Valeur et résultats de l'inoculation à la souris des mycobactéries. *Soc. Sci. Vét. et Méd. comparée*, Lyon, 1963, 65, n° 2.
- (317) VIRTANEN (S.). — A study of nitrate reduction by *Mycobacteria*. *Acta Tuberculosa Scandinavia*, 1960, suppl. 48, 1-119.
- (318) WAYNE (L.-G.), JUAREZ (W.-J.) et NICHOLS (E.-G.). — Aryl-sulfatase activity of aerobic « actinomycetales ». *J. Bact.*, 1958, 75, 367-368.
- (319) WEED (L.-A.), KARLSON (A.-G.), IVINS (J.-C.) et MILLER (R.-H.). — Recurring migratory chronic osteomyelitis associated with saprophytic acid-fast bacilli : Report of a case of 10 years' duration apparently cured by surgery. *Proc. Mayo Clin.*, 1956, 31, 238-246.
- (320) WEED (L.-A.), KEITH (H.-M.) et NEEDHAM (G.-M.). — Non tuberculous acid-fast bacilli in cervical adenitis. *Pediatrics*, 1957, 20, 688.
- (321) — Non tuberculous acid fast cervical adenitis in children. *Proc. Staff. Meetings Mayo Clin.*, 1956, 31, 8.
- (322) WEED (L.-A.), MAC DONALD et NEEDHAM (G.-M.). — The isolation « saprophytic » and fast bacilli from lesions of caseous granuloma. *Proc. Staff. Meetings Mayo Clin.*, 1956, 31, 8.
- (323) WELLS (D.-G.), AGIUS (E.) et SMITH (E.). — *Mycobacterium fortuitum*. *Amer. Rev. Tub.*, 1955, 72, 53-63.
- (324) WESTPHALL (W.), DICKEL (H.) et PRANCE (H.). — Recherche sur les ganglions lymphatiques du porc, porteurs de lésions tuberculiformes. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 1961, 12, 25.
- (325) WILLIAM SMITH (H.). — The isolation of mycobacteria from the mesenteric lymphnodes of domestic animals. *J. Path. Bact.*, 1954, 68, 367.

- (326) WILSON et NORTON. — The clinical incidence of acid bacilli non pathogenic for guinea pigs. *Amer. Rev. Tub.*, 1956, 73, 351.
- (327) WILSON (F.-J.), KALISH (C.) et FISH (C.-H.). — Use of oxydation-reduction dyes in the determination of virulence of *Mycobacteria* « in vitro ». *Amer. Rev. Tub.*, 1952, 65, 187-193.
- (328) WOLINSKY (E.), SMITH (M.-M.), MITCHEL (R.-S.) et STEENKEN (W.-J.). — A typical chromogenic mycobacteria associated with pulmonary disease including a report of three cases. *Amer. Rev. Tub.*, 1957, 75, 180-198.
- (329) WOOD (L.-B.), BUHLER (V.-B.) et POLLAK (A.). — Human infection with the yellow and fast bacillus. *Amer. Rev. Tub.*, 1956, 73, 917-929.
- (330) X... — A new mycobacterium. *British Med. J.*, 1955, p. 340.
- (331) XALABARDER (C.). — The so-called problem of unclassified mycobacteria. A review. *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 1961, 83, 1,15.
- (332) YEGLAN (D.) et BUDD (V.). — The growth and enumeration of *Mycobacteria* in transparent agar medium. *Amer. Rev. Tub.*, 1951, 64, 81-86.
- (333) YOUMANS (G.-P.). — Les bacilles acido-résistants « atypiques ». Etudes poursuivies aux Etats-Unis. *Bull. Un. Int. Tuberc.*, 1958, 28, 136-160.
- (334) YOUMANS (G.-P.), PARLETT (R.-C.) et YOUMANS (A.-S.). — The significance of the response of mice to immunization with viable unclassified mycobacteria. *Amer. Rev. Respir. Dis.*, 1961, 83, 903-905.
- (335) YOUMANS (A.-S.) et YOUMANS (G.-P.). — The production of « anti-isoniazid » substance by isoniazid-susceptible, isoniazid-resistant and unclassified strains of *Mycobacteria*. *Amer. Rev. Respir. Dis.*, 1960, 81, 929-931.
- (336) YOUMANS (G.-P.), YOUMANS (A.-S.) et PARLETT (R.). — *Amer. Rev. Respir. Dis.*, 1960, 82, 114.
- (337) YOUNG (D.-R.). — Pulmonary disease simulating tuberculosis and caused by chromogenic acid-fast bacilli. *Lancet*, 1955, n° 6893, 750-752.
- (338) ZEBROWSKI. — Observations sur les propriétés immunisantes des saprophytes a.a.r. *Bertr. Klin. Tub.* (Berlin), 1956, 115, 347.
- (339) ZETTERGREN (L.) et ZETTERBERG (B.). — The swimming pool disease (« *Mycobacteriosis balenaria* »). *Acta Soc. Med. upsalien.*, 1956, 61, 47-74.

TABLE DES MATIERES

Avant-Propos	11
Introduction	13
<i>Première partie. — LES MYCOBACTÉRIES ATYPIQUES</i>	15
Définition. Synonyme. Historique	17
<i>Chapitre premier : Morphologie et coloration</i>	23
<i>Chapitre II : Culture</i>	27
<i>Chapitre III : Biochimie</i>	33
A - Activités enzymatiques	33
B - Utilisation des hydrates de carbone en milieu synthétique	45
C - Virage globulaire	46
D - Antibiosensibilité	46
E - Tests biochimiques de différenciation	48
<i>Chapitre IV : Biologie</i>	53
A - Pouvoir pathogène et virulence	53
I. Pouvoir pathogène <i>in vivo</i>	53
II. Appréciation du pouvoir pathogène <i>in vitro</i>	57
B - Pouvoir antigène	65
C - Pouvoir immunigène	67
D - Pouvoir allergène	68
E - Bactériophagosensibilité	70
<i>Chapitre V : Place dans la systématique et essais de classification</i>	75

<i>Deuxième partie. — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE 3 SOUCHES</i> <i>DE Mycobacterium Aquae</i> ISOLÉES DANS LA THÉLITE TUBERCULOÏDE DE LA VACHE LAITIÈRE	87
I. — Caractères cultureux	89
II. — Caractères biochimiques	91
III. — Propriétés biologiques - Pouvoir pathogène expé- rimental	92
IV. — Pouvoir allergène	95
<i>Conclusions générales</i>	105
<i>Bibliographie</i>	107

